

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie

Katedra parazitologie



Bc. Jana Choutková

Interakce myších roupů a trichomonád
Interactions of mouse pinworms and trichomonads

Diplomová práce

Školitel: Prof. RNDr. Petr Horák, Ph.D.
Školitel specialista: RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.

Praha 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 24. 8. 2012

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli Petru Horákovi a školiteli specialistovi Ivanu Čepičkovi za odborné vedení, ochotu a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat profesoru Kuldovi za poskytnuté konzultace a samozřejmě celému osazenstvu helmintologické laboratoře za několik let studia strávených v neobyčejně příjemné společnosti. Zvláštní poděkování patří mým blízkým za všechny formy podpory.

ABSTRAKT

Roupi druhů *Aspiculuris tetraptera* a *Syphacia obvelata* patří k běžným střevním parazitům myši domácí, stejně jako trichomonády několika druhů. Nejčastěji nalézanou trichomonádou je *Tritrichomonas muris*, a dále ve střevě myši bývají přítomny druhy *Tritrichomonas minuta*, *Pentatrichomonas hominis* a *Hexamastix muris*. Je známo, že za určitých podmínek se trichomonády mohou vyskytovat ve střevě myších roupů (Theiler a Farber, 1936). Konkrétně byl zaznamenán výskyt *T. muris* ve střevě obou druhů myších roupů, a to překvapivě i v roupech pocházejících z myší zdánlivě bez nákazy trichomonádou. V roce 1933 Becker pozoroval trofozoity *T. muris* ve vajíčku roupa *S. ovelata*. Na základě těchto nálezů byla zformulována hypotéza o přenosu těchto trichomonád vajíčky hlístice, tedy způsobem analogickým k přenosu *Histomonas meleagridis*.

V této práci dokumentujeme přítomnost trichomonád v tělech roupů, určujeme jejich lokalizaci, druh, popisujeme jejich morfologii ve střevě roupů a na základě výsledků hodnotíme možný význam interakce trichomonád a roupů pro přenos prvoků na nové savčí hostitele. Trichomonády byly pomocí klasické histologie, *in situ* hybridizace a transmisní elektronové mikroskopie prokázány výhradně v lumenu střeva roupů a vyskytovaly se po celé délce střeva, přičemž *in vivo* vykazovaly typickou motilitu (bylo pozorováno vlnění undulující membrány). Data získaná během pitev 55 myší ukázala, že trichomonády se častěji vyskytují ve střevě roupa *A. tetraptera* (a to jak u myší s infekcí jedním druhem roupa, tak i při koinfekcích oběma druhy). DNA analýza a elektronová mikroskopie roupů pozitivních na trichomonády prokázaly, že prvoci vyskytující se v roupech přísluší do ruhů *T. muris* a *T. minuta*. TEM dále umožnila studovat prvoky ve střevě roupů – nebyla zaznamenána interakce trichomonád se střevním epitelem roupů ani buněčné dělení; prokázána byla tvorba pseudocyst *T. muris* ve střevě roupů.

Dosažené výsledky nepodporují teorii o přenosu prvoků vajíčky hlístic, a naopak naznačují, že přítomnost trichomonád v tělech roupů je pouze náhodná.

Klíčová slova: trichomonáda, roup, myš, *Tritrichomonas*, *Aspiculuris*, *Syphacia*, *Histomonas*, *Heterakis*, přenos

ABSTRACT

Oxyurid nematodes *Aspicularis tetraptera* and *Syphacia obvelata* are both common mouse intestinal parasites; in the same location several species of trichomonads occur. *Tritrichomonas muris* is the most often found, but there are also some others: *Tritrichomonas minuta*, *Pentatrichomonas hominis* or *Hexamastix muris*. It is known that, under some circumstances, trichomonads can be found in the intestine of mouse pinworms, as reported by Theiler and Farber (1936) for *T. muris* in *A. tetraptera* and *S. obvelata*. What is interesting, trichomonads were found also in pinworms from trichomonad-negative mice. In 1933, Becker observed motile trophozoites of *T. muris* in the egg of *S. obvelata*. These observations offer a chance that the protist may be transmitted to a new host in similar manner (*via* pinworm eggs) as it was described for *Histomonas meleagridis*.

In our study we document trichomonads in pinworm bodies, determine species of trichomonads, search for their localization, morphology and, based on the data, assess possibility of trichomonad transmission to a new mammalian host *via* pinworm eggs. By use of classical histology, *in situ* hybridization and transmission electron microscopy, we observed trichomonads exclusively in the intestinal lumen of both pinworm species. They were found in the entire pinworm intestine and, if alive, they showed typical motility (undulating membrane can be observed). The data collected from autopsy of 55 mice showed that trichomonads are more often found in the intestine of *A. tetraptera* (in mice infected with either one or two pinworm species). DNA analysis of trichomonad-positive pinworms, as well as TEM identified the species of trichomonads present in pinworm bodies as *T. muris* and *T. minuta*. Electron microscopy also allowed description of trichomonads in the pinworm intestine – no interaction with intestinal epithelium and no cell division was detected. Trichomonads of *T. muris* were found to form pseudocysts.

Results achieved in this study do not support the theory about transmission of these protists *via* pinworm eggs, and suggest the presence of these protists in pinworm bodies is accidental.

Key words: trichomonads, pinworm, mouse, *Tritrichomonas*, *Aspicularis*, *Syphacia*, *Histomonas*, *Heterakis*, transmission.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1	Interakce hlístic a „mikroparazitů“	2
2.1.1	Hlístice a viry – přenos onemocnění rostlin	2
2.1.2	Výskyt bakterií v tělech hlístic	2
2.1.3	Interakce hlístic a prvoků ve střevě hostitele	6
2.1.4	Výskyt prvoků v tělech hlístic	8
2.1.5	Přenos trichomonád hlísticemi na nové hostitele	10
2.2	Schopnost adheze a invaze u trichomonád	13
2.2.1	<i>Trichomonas vaginalis</i>	13
2.2.2	<i>Trichomonas gallinae</i>	14
2.2.3	<i>Tritrichomonas foetus</i>	15
2.2.4	<i>Histomonas meleagridis</i>	15
2.2.5	<i>Cochlosoma anatis</i>	16
2.3	Roupi a střevní trichomonády myši domácí	17
2.3.1	Oxyurida	17
2.3.2	Parabasalia	19
3	CÍLE PRÁCE	21
4	MATERIÁL A METODIKA	22
4.1	Pitvy	22
4.1.1	Odečítání intenzity infekce trichomonádami	22
4.2	Barvení klasickými histologickými technikami	23
4.2.1	Fixace	23
4.2.2	Zalévání do JB-4 média	23
4.2.3	Barvení	25
4.3	Stříbření AgNO ₃	27
4.4	Barvení protargolem podle Bodiana	28
4.5	Příprava vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM)	30
4.6	Chromogenní <i>in situ</i> hybridizace (CISH)	31
4.6.1	Příprava histologických řezů pro CISH – fixace, zalévání, krájení	32
4.6.2	<i>In situ</i> hybridizace	33
4.7	Mikroskopické pozorování a zpracování preparátů	36
4.8	DNA analýza	36
4.8.1	Příprava vzorků	36
4.8.2	Izolace DNA	36
4.8.3	Amplifikace DNA	37
4.8.4	Gelová elektroforéza	38
4.8.5	Purifikace PCR produktu	38
4.8.6	Klonování	38
4.8.7	Sekvenační reakce	40
4.8.8	Vyhodnocení sekvencí a fylogenetická analýza	41
4.8.9	Tvorba a úprava "alignmentu"	41
4.8.10	Tvorba fylogenetického stromu	42
5	VÝSLEDKY	43
5.1	Data získaná během pitev	43
5.2	Klasická histologie a další techniky – dokumentace přítomnosti trichomonád v tělech roupů	47
5.2.1	Hledání trichomonád mimo střevo roupů	48

5.2.2	Stříbření AgNO ₃	49
5.2.3	Barvení protargolem podle Bodiana.....	49
5.3	Lokalizace trichomonád v roupech pomocí <i>in situ</i> hybridizace.....	50
5.4	Popis trichomonád ve střevě roupů pomocí TEM.....	51
5.4.1	Určení druhu trichomonád pomocí TEM	51
5.4.2	Nalezené druhy trichomonád.....	55
5.4.3	Popis nalezených trichomonád	56
5.5	Fylogenetická analýza	57
6	DISKUZE	60
6.1	Výskyt trichomonád v tělech myších roupů.....	60
6.2	Určení lokalizace trichomonád v tělech roupů.....	62
6.3	Určení druhů trichomonád	65
6.4	Trichomonády ve střevě roupů pohledem TEM	68
6.5	Význam interakce myších trichomonád a roupů pro přenos trichomonád na nové hostitele?.....	69
7	ZÁVĚR.....	71
8	SEZNAM LITERATURY	72

1 ÚVOD

Ve střevě myši domácí nacházíme množství parazitů, mezi nimiž jsou kromě jiných běžně zastoupené dvě skupiny – roupí (*Aspiculuris tetraptera* a *Syphacia obvelata*) a trichomonády (v našich podmínkách *Tritrichomonas muris*, *Tritrichomonas minuta*, *Pentatrichomonas hominis* a *Hexamastix muris*). Mezi zástupci obou skupin byly zaznamenány interakce, které jsou motivem a oblastí zájmu této práce. Zmíněnými interakcemi je popsán výskyt trichomonád *T. muris* ve střevě roupů *A. tetraptera* a *S. obvelata* (Theiler and Farber, 1936) a nález trofozoitů *T. muris* ve vajíčku roupa *S. obvelata* (Becker, 1933).

Přítomnost prvoků a dalších „mikroparazitů“ v tělech nematodů není ojedinělou záležitostí. Takové nálezy mohou dokumentovat asociace čistě náhodného charakteru i interakce úzce specifické, nabývající velkého ekonomického významu a hrající roli v biologii interagujících organismů (dobře známé příklady jsou entomopatogenní hlístice v asociaci s bakteriemi ze skupiny Enterobacteriaceae, nebo asociace filárií a bakterií rodu *Wolbachia*). Jako jeden z „typů“ interakcí můžeme označit přítomnost „mikroparazita“ v tělech hlístic za účelem přenosu na nové hostitele. Organismy účastníci se takové asociace jsou například pro rostliny patogenní viry, které jsou přenášeny hlísticemi živícími se na kořenovém systému rostlin, nebo patogenní prvok *Histomonas meleagridis* přenášený vajíčky škrkavky *Heterakis gallinarum* na nového hostitele – krůtu. Hypotéza o přenosu byla vyslovena i v případě myších trichomonád a roupů, nebo trichomonády *Dientamoeba fragilis* a roupa dětského, *Enterobius vermicularis*. Předmětem této práce je zaměřit se právě na interakci myších parazitů. Ačkoliv myší paraziti nejsou ekonomicky významnými, zaměření se právě na ně by mohlo mít přínos (například v oblasti použité metodiky) v osvětlení přenosu jiných parazitů, např. prvoka *Dientamoeba fragilis* a roupa *Enterobius vermicularis*, kteří jsou lidskými parazity a v některých případech i významnými patogeny.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Interakce hlístic a „mikroparazitů“

Následující kapitola poskytuje čtenáři přehled popsanych interakcí hlístic a „mikroparazitů“ (v pojetí virů, bakterií, prvoků) počínaje výčtem interakcí, které probíhají při koinfekcích ve střevě hostitele, přes náhodný výskyt „mikroparazitů“ v tělech hlístic až k úzce specifickým asociacím, například ve smyslu přenosu na nové hostitele.

2.1.1 Hlístice a viry – přenos onemocnění rostlin

Ačkoli již dříve bylo známo, že viry se mohou v tělech hlístic vyskytovat, poprvé v roce 1958 bylo dokázáno, že půdní hlístice rodu *Xiphinema* živící se na kořenech rostlin jsou schopny přenášet virus způsobující onemocnění vinné révy zvané vějířovistost (fanleaf virus) (Hewitt a kol., 1958). Od té doby se seznam hlístic parazitujících na rostlinných pletivech a schopných přenášet viry působící onemocnění rostlin (rajčat, broskví, tabáku, třešní) značně prodloužil. Hlístice přenášející viry jsou kosmopolitně rozšířené a přísluší do dvou čeledí – Longidoridae (rod *Longidorus*, *Paralongidorus* a *Xiphinema*) a Trichodoridae (rod *Trichodorus* a *Paratrachodorus*). Hlístice z čeledi Longidoridae přenášejí viry ze skupiny nepovirů a Trichodoridae viry ze skupiny tobravirů (O'Bannon a Inserra, 1990). Nákaza probíhá tak, že hlístice nejprve pozřou virus spolu s rostlinným materiálem, kterým se živí (Das a Raski, 1968), a viry se poté usazují v buňkách v určitém sektoru přední části trávicí soustavy hlístice. Toto umístění je rodově specifické (Robertson a Taylor, 1975 cit. dle O'Bannon a Inserra, 1990). Viry nepřežívají svlékání hlístice a nejsou přenášeny jejími vajíčky (Harrison a Winslow, 1961). Zdravá rostlina je poté nakažena inokulací slin hlístice s virovými částicemi (Robertson a Taylor, 1975 cit. dle O'Bannon a Inserra, 1990).

2.1.2 Výskyt bakterií v tělech hlístic

Hlístice i bakterie zastupují velmi početné skupiny organismů které spolu v prostředí přirozeně interagují; bakterie se za určitých situací vyskytují v tělech hlístic. Mnohé hlístice využívají bakterie jako zdroj potravy, jindy může být přítomnost bakterie v těle hlístice čistě náhodná, ale vyvinuly se i velmi specifické asociace, které je možné označit za mutualistické. Příklady výskytu bakterií v tělech hlístic a jejich význam stručně shrnuje tato kapitola.

2.1.2.1 *Aspiculuris tetraptera*, *Syphacia obvelata* a střevní bakterie myši

Z obsahu tlustého a slepého střeva hostitele, a zároveň z homogenátů rousů *Aspiculuris tetraptera* a *Syphacia obvelata* bylo izolováno několik druhů bakterií. Studie ukázala, že rousi selektivně pohlcují jen některé (a každý druh rousa odlišné) druhy bakterií. V prostředí střeva se totiž vyskytovala bohatší škála druhů bakterií než v samotných roupech (Dunning a Wright, 1970). Podobná selektivita hlístic v příjmu bakterií není ojedinělou záležitostí. Například hlístice rodu *Pristionchus* (Rae a kol., 2008) nebo druhu *Caenorhabditis elegans* (Schulenburg a Ewbank, 2007), které jsou častým laboratorním modelem, jsou schopny rozpoznat pro ně patogenní bakterie a těm se v příjmu potravy vyhnout. *Caenorhabditis elegans* naopak přednostně přijímá takové druhy bakterií, které více podporují růst (Shtonda a Avery, 2006). Přítomnost střevních bakterií je nutná pro přežití a vývoj myších rousů ve střevě hostitele, což dokládá neúspěšný pokus nakazit myši bez střevních bakterií rousy *A. tetraptera* (Przyjalkowski, 1972).

2.1.2.2 Diseminace a přenos bakterií hlísticemi

Důležitým aspektem vyplývajícím z přítomnosti bakterií v tělech nematodů (ať už volně žijících nebo parazitických) je možnost diseminace nebo přenosu patogenních druhů bakterií mezi vnímavými hostiteli. Ve střevě volně žijící hlístice rodu *Pristionchus* se může vyskytovat velké množství bakterií z jejich potravy, mezi nimi i druhy patogenní pro rostliny, které přežijí pasáž zažívací soustavou hlístice, a jsou tak diseminovány v prostředí (Chantanao a Jensen, 1969; Rae a kol., 2008). Další volně žijící hlístice *Caenorhabditis elegans* může sloužit jako vektor bakterií, z nichž některé jsou závažnými patogeny člověka (Anderson a kol., 2003). Bakterie rodu *Salmonella* náhodně pozřená *C. elegans* vykazuje zvýšenou odolnost proti působení vnějších vlivů (oproti bakteriím přítomným volně v prostředí) a při konzumaci hlístice vnímavým hostitelem (v pokusu myš) se může vyvinout systémová infekce (Lacharme-Lora a kol., 2009a). Bakterie *Legionella* spp. kolonizuje střevní trakt *C. elegans* a přítomnost bakterie vede k smrti červa. U málo vnímavých jedinců však dochází k tvorbě forem morfologicky podobných cystám prvoků, které jsou vyloučeny do prostředí a mohou nakazit další generaci hlístic. Hlístice tak slouží jako rezervoár a napomáhají šíření bakterie v prostředí (Brassinga a kol., 2010). Parazitické hlístice rodu *Cooperia* a *Ostertagia* ze střeva hovězího dobytka a ovčí pravděpodobně hrají roli v přenosu patogenů dobytka a lidí (Lacharme-Lora a kol., 2009b). Z těl hlístic bylo vykultivováno množství druhů bakterií, a to včetně patogenních, a proto byla navržena hypotéza o možném přenosu bakterií mezi hostiteli díky jejich přítomnosti v těle hlístice.

2.1.2.3 Mutualistické asociace hlístic a bakterií

2.1.2.3.1 Entomopatogenní hlístice skupiny Rhabditida a bakterie skupiny Enterobacteriaceae

Symbiotický vztah entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema* a *Heterorhabditis* s bakteriemi rodu *Xenorhabdus* respektive *Photorhabdus* je poměrně detailně zdokumentován. L3 stadium hlístice (nebo také dauer larva), které je pozastavené ve vývoji a vyskytuje se v půdě, nese ve svém těle symbiotické bakterie. Bakterie rodu *Xenorhabdus* jsou ve svém hostiteli (hlístici rodu *Steinernema*) umístěny ve speciálním váčku ve střevě (Bird a Akhurst, 1983), zatímco bakteriální endosymbionti hlístic rodu *Heterorhabditis* (bakterie rodu *Photorhabdus*) se vyskytují volně ve střevě (Ciche a Ensign, 2003). Po vniknutí hlístice přirozenými tělními otvory do larvy hmyzu jsou bakterie regurgitovány do hemolymfy, množí se, a díky produkci toxinu oběma organismy larva během několika dnů umírá (Goodrich-Blair, 2007). Bakterie se poté intenzivně množí v mršině a hlístice se živí jak tkáněmi degradovanými působením bakterií, tak bakteriemi samými. Po několika generacích se opět vyvíjí L3 s několika střevními bakteriemi získanými z rektálních žlaz matky a cyklus se opakuje (Ciche a kol., 2008). Larvy *Heterorhabditis* se líhnou v děloze matky a konzumují její tkáň. Tento proces se nazývá *endotokia matricida* (Johnigk a Ehlers, 1999). Nebylo doposud osvětleno, jaké lokalizace v těle matky jsou bakteriemi osidlovány infekční larvy hlístic rodu *Steinernema*. Bylo dokázáno, že oba organismy ze vztahu profitují. K intenzivnějšímu množení hlístice rodu *Steinernema* dochází za přítomnosti bakterie (Sicard a kol., 2003). Bakterie rodů *Xenorhabdus* a *Photorhabdus* nejsou volně v prostředí schopny přežít více než několik dní (Morgan a kol., 1997). U hlístice dochází k reprodukčnímu „trade-off“ (kompromisu) – jak mortalita, tak reprodukční rychlost pozitivně koreluje s množstvím bakterií, které hostí infekční larva (Emelianoff a kol., 2008; Emelianoff a kol., 2007).

O podobné asociaci bylo uvažováno i u hlístice *Phasmarhabditis hermaphrodita*, která je patogenní pro slimáky a má podobný životní cyklus. Z jejích larev stadia L3 bylo vykultivováno několik druhů bakterií (Wilson a kol., 1995). Ukázalo se, že patogenita hlístice pro slimáky se liší podle druhu bakterie, kterou se hlístice v laboratoři živí. Hlístice jako prostředek pro biologickou kontrolu slimáků byly udržovány na bakterii *Moraxella osloensis*, která se ukázala být pro slimáky patogenní (Tan a Grewal, 2001). Vztah bakterie a hlístice začal být chápán jako analogický tomu, který je popsán u entomopatogenních hlístic (Pechová a Foltan, 2008). Ukázalo se však, že hlístice *P. hermaphrodita* ve svém těle bakterie *M. osloensis* neudrží a pohlcuje náhodné bakterie z konzumované mršiny slimáka (Rae a kol., 2010).

2.1.2.3.2 Hlístice skupiny Onchocercidae a bakterie rodu *Wolbachia*

Jinou dobře popsanou interakcí hlístic a bakterií je mutualistický vztah bakterií rodu *Wolbachia* a filárií čeledi Onchocercidae. Přítomnost bakterií v tělech hlístic je zcela zásadní pro jejich vývoj, růst, plodnost a životaschopnost. Bakterie jsou u hlístic lokalizovány intracelulárně v laterálních výběžcích hypodermis, a to ve váčcích vytvořených z hostitelských tkání (Taylor a kol., 2005). Bakterie se během vývoje hlístice přesouvají z hypodermis tělní dutinou do reprodukční soustavy, kde infikují oocyty na počátku jejich vývoje (Fischer a kol., 2011) a lokalizují se v buněčné linii embryí, ze které se v pozdějším vývoji tvoří hypodermis. V každém embryu se nachází přibližně 70 bakterií (Landmann a kol., 2011) a tento počet se během vývoje larvy (v L1, L2 a L3 stadiu) nemění (McGarry a kol., 2004). Populace bakterií se významně zmnožuje (cca 600x) po vstupu larev do savčího hostitele (v L4 stadiu) a zůstává početná i ve stadiu dospělce. Bakterie obsazují hypodermální tkáň a posléze postupují do reprodukční soustavy dospělých samic (McGarry a kol., 2004). Přítomnost bakterií je zásadní pro vývoj larev v savčím hostiteli a pro dlouhodobé přežívání dospělců. Ztráta bakterií rodu *Wolbachia* po léčbě antibiotiky indukuje u hlístice apoptózu buněk reprodukční soustavy, embryí a somatických buněk (Landmann a kol., 2011). Bakterie zajišťují biosyntézu hemu, nukleotidů, riboflavinu a FAD, tedy látek, pro jejichž syntézu chybí hlístici geny (Foster a kol., 2005; Slatko a kol., 2010). Bakteriální endosymbionti filárií hrají důležitou roli v patogenezi onemocnění. Jelikož bakterie byly nalezeny i v lumenu vylučovací soustavy červů, mohou být bakterie, respektive jejich produkty vypouštěny do prostředí (Landmann a kol., 2010). Lipoprotein bakterií je rozpoznáván Toll-like receptory buněk imunitního systému hostitele, což vede k produkci zánětlivých buněk hostitelským organismem a poškozování tkání parazitovaných filáriemi (Turner a kol., 2009). Byla vyslovena hypotéza, že zánětlivá reakce zprostředkovaná bakteriemi blokuje imunitní reakci mířenou proti hlísticím, a nepřímo se tak podílí na dlouhověkosti filárií (Hansen a kol., 2011).

2.1.3 Interakce hlístic a prvoků ve střevě hostitele

Koexistence více parazitů v jednom hostiteli a jedné orgánové soustavě hostitele přirozeně ústí ve vzájemné komplexní interakce parazitů a hostitele, a vede k ovlivnění parazitů v jejich schopnosti množení, patogenity atd. Interakce zaznamenané během experimentálních infekcí modelových organismů mohou být rozděleny do dvou skupin – antagonistické a synergistické (Christensen a kol., 1987). V podkapitolách 2.1.3.1 a 2.1.3.2 jsou uvedeny zaznamenané příklady interakcí hlístic a prvoků, které se alespoň v části životního cyklu vyskytují v trávicí soustavě hostitele.

2.1.3.1 Antagonistické interakce

Antagonistickými interakcemi rozumějme takové interakce, kdy v případě, že je hostitel nakažen dvěma parazity, je vývoj alespoň jednoho z těchto parazitů negativně ovlivněn (v porovnání se stavem, kdy hostitel trpí nákazou pouze jedním z těchto parazitů).

Pravděpodobně díky zánětu střeva během střevní fáze nákazy *Trichinella spiralis* došlo k redukci počtu produkovaných cyst *Giardia muris* u myší (Robertsthompson a kol., 1976) a oocyst *Eimeria nieschulzi* u krys (Stewart a kol., 1980) v případě, že byly krysy nejprve nakaženy hlísticí a poté prvokem. U *G. muris* byla také zaznamenána redukce počtu trofozoitů ve střevě, pravděpodobně v důsledku patogenních změn střevní sliznice, které činí prostředí nepříhodné pro proliferaci trofozoitů. Ve studii o koinfekci *T. spiralis* a *E. nieschulzi* autoři pozorovali, že pokud byly krysy nejdříve nakaženy prvokem, došlo k signifikantnímu poklesu počtu hlístic ve střevě, posunu jejich místa výskytu v tenkém střevě, snížení plodnosti u samic a méně larev se dostalo do svalové fáze. Při koinfekci krutí trichomonády *Histomonas meleagridis* a škrkavky *Heterakis gallinarum*, jejichž blízké asociaci je níže věnována celá kapitola, byla zaznamenána významná redukce počtu škrkavek ve střevě hostitele pravděpodobně v důsledku změn ve struktuře střevní stěny způsobených penetrací prvoka z lumenu střeva do submukózy (Ohara a Reid, 1961).

Nákaza hlísticí *T. spiralis* má protektivní účinek vůči amébovému jaternímu abscesu způsobenému amébou *Entamoeba histolytica* (u křečků nakažených *T. spiralis* se absces vyvinul u 26%, zatímco u křečků bez nákazy *T. spiralis* v 80% případů), a to pravděpodobně díky nespecifické aktivaci buněčné imunity (Meerovitch a Ghadirian, 1980).

2.1.3.2 Synergistické interakce

Synergistickými interakcemi rozumíme takové interakce, kdy v případě, že je hostitel nakažen dvěma parazity, je vývoj alespoň jednoho z těchto parazitů pozitivně ovlivněn (v porovnání se stavem, kdy hostitel trpí nákazou pouze jedním z těchto parazitů).

V rámci synergistických interakcí byl opakovaně zaznamenán efekt infekce střevními prvoky na průběh souběžné infekce helminty. Při simultánní infekci krys kokciemi *Eimeria nieschulzi* a hlísticemi *Trichinella spiralis* se ve střevě hostitele nacházelo nejméně čtyřikrát více hlístic oproti kontrolám bez nákazy kokciemi (Duszynski a kol., 1978). Výsledek je opačný než ve studii autorů Stewart a kol. (1980), kteří se zabývali interakcí stejných parazitů. Zaznamenaná interakce stejné kokcidie v koinfekci s hlísticí *Nippostrongylus brasiliensis* spočívala v prodloužení doby pobytu hlístice ve střevě hostitele a zvýšení produkce vajíček oproti kontrolám s jednoduchou infekcí (Bristol a kol., 1983).

Jiné studie dokládají, že také infekce hlístic může mít efekt na souběžnou infekci protozoárního původu. Myši s primární infekcí hlísticemi *Syphacia obvelata* (Vinayak a Chopra, 1978), respektive *Trichuris muris* (Knight a Chew, 1974) se ukázaly být vnímavější k infekci *Entamoeba histolytica*. Po intracékalní inokulaci trofozoitů améb myši vykazovaly vážnější poškození stěny střeva a četnější invaze tkáně amébami. Příčinou tohoto jevu bylo podle autorů narušení střevní sliznice vlivem hlístice v kombinaci se sníženou imunitou, která provází chronickou infekci červem. Při koinfekci telat parazity jejich tenkého střeva, kokciemi *Eimeria* spp. a hlísticemi *Trichostrongylus colubriformis* (Davis a kol., 1960b) a *Strongyloides papillosus* (Davis a kol., 1960a) byla zaznamenána zvýšená vnímavost telat k infekci kokciemi – v trusu telat s koinfekcí byly nalezeny vyšší počty oocyst kokcií pravděpodobně proto, že narušení střevního povrchu vlivem hlístic učinilo prostředí příhodnější pro vývoj prvoka. Během akutní fáze infekce *T. spiralis* u myši docházelo k zánětu a zároveň stimulaci růstu a množení prvoka *Giardia intestinalis* ve střevě hostitele, přestože imunitní odpověď proti prvokům během infekce hlístic nebyla oslabena (von Allmen a kol., 2006). Výsledek je opačný, než k jakému dospěli Robertsthomson a kol. (1976).

Příkladem toho, že imunitní odpověď proti hlístici může ovlivnit odpověď na souběžnou protozoární infekci, je následující nález. Během akutní fáze infekce hlístic *Heligmosomoides polygyrus* v tenkém střevě myši se vyvíjí silná imunitní odpověď Th2 typu a dochází ke zvýšené reprodukci kokcidie *Eimeria falciformis* ve slepém střevě myši v důsledku potlačení konkurenční imunitní odpovědi typu Th1, která je účinná proti protozoární infekci (Rausch a kol., 2010).

2.1.4 Výskyt prvoků v tělech hlístic

2.1.4.1 Microspora

Mikrosporidie, obligátní intracelulární organismy příbuzné houbám, byly identifikovány zejména v tělech volně žijících hlístic. Nejpodrobněji popsanou mikrosporidií z hlístic je *Nematocida parisii*, která byla objevena ve střevním epitelu *Caenorhabditis elegans* (Troemel a kol., 2008) v různých lokalitách v okolí Paříže. *Nematocida parisii* invaduje střevní buňky, podstupuje zde vegetativní fázi svého životního cyklu, a poté uniká z buňky ve formě spory pomocí relokalizace aktinu a rozvolnění cytoskeletu v terminální části enterocytů (Estes a kol., 2011). Blízce příbuzná mikrosporidie byla nalezena v *Caenorhabditis briggsae* v Indii (Hodgkin a Partridge, 2008). *Nematocida parisii* se mezi hostiteli přenáší horizontálně a pravděpodobně se vyskytuje pouze v buňkách střeva.

V tělech volně žijící mořské hlístice *Odontophora rectangula* byla identifikována mikrosporidie, kterou DNA analýza zařadila do příbuznosti s rodem *Encephalitozoon* zahrnujícím i lidské parazity. U samců byly nalezeny spóry ve váčcích v hypodermis a svalovině, zatímco u samic byly identifikovány pouze vegetativní stadia ve vajíčkách; pravděpodobně je tedy tato mikrosporidie přenášena vertikálně (Ardila-Garcia a Fast, 2011).

Z těl půdních hlístic druhu *Plectus communis*, které uhynuly na houbové onemocnění, byla vykultivována mikrosporidie druhu *Microsporon gypseum*, původce kožního onemocnění rukou lidí ze skupiny „gardeners illnesses“ (Szathmar, 1966). Ačkoli mikrosporidie se mohla do uhynulých hlístic dostat sekundárně, existuje možnost, že půdní hlístice slouží jako rezervoár infekce tohoto parazita patogenního pro člověka.

I u parazitických hlístic se vyskytují mikrosporidie. Dokládá to existence druhu *Thelohania reniformis* objevená ve střevních buňkách myšího červa *Protospirura muris* (Kudo a Hetherington, 1922).

2.1.4.2 Diplomonadida

Diplomonády rodu *Giardia* běžně parazitují v horní části tenkého střeva široké škály obratlovců. Příležitostně jsou prvoci nalézáni ve střevě parazitických hlístic obývajících v hostiteli stejnou část jeho zažívacího traktu.

V několika případech byl zdokumentován výskyt prvoků rodu *Giardia* ve střevě trichostrongyloidních hlístic. Jedinci *Giardia visciae* byli nalezeni v lumenu střeva *Viannella sp.* z čínčily *Viscacia viscacia* (Thomson, 1925 cit. dle Graham, 1935), v jiném

případě byli prvoci *Giardia* sp. přítomni ve střevě hlístic *Cooperia oncophora* z býka (Graham, 1935), *Nematodirus helvetianus* z ovce (Bowman a kol., 1990) a *Nematodirus fillicollis* z ovce (Dissanaïke, 1954). Trofozoiti se ve střevě červů vyskytovali v různých počtech (až stovky jedinců), přičemž vykazovali motilitu po celé délce střeva červa. Cysty giardií nebyly nalezeny. V případě výskytu giardií v červech z býka a činčily prvoci nebyli nalezeni ve střevě hostitele, pouze ve střevě hlístic. Jako vysvětlení bylo navrženo, že trofozoiti jsou schopni v červech nezávisle přežívat do doby, kdy jejich hostitel pomocí imunity potlačí protozoární infekci ve svém střevě (Ranford a kol., 2001)

Giardie byly nalezeny i v hlísticích z čeledi Ancylostomatidae (měchovci). Prvoci se vyskytovali ve střevě ovčího měchovce *Bunostomum trigonocephalum* (Dissanaïke, 1954) a běžného psího červa *Ancylostoma caninum* (Ranford a kol., 2001). Ani v těchto případech nejevili pohlcení trofozoiti známky poškození. Měchovci tráví většinu času přichycení k mukóze střeva hostitele a trofozoity giardií pravděpodobně pohltili při změně místa přichycení, přičemž na novém místě byli přisedlí prvoci (Kalkofen, 1970).

Greenberg a Spira (1972) popisují infekci myších červů *Nematospiroides dubius* dvěma druhy diplomonád zároveň. Ve všech z 3000 dospělců a larev *N. dubius* získaných z myši našli aktivní trofozoity *Giardia muris* a *Hexamita* sp.. Pouze několik giardií bylo přisedlých k epitelu střeva hlístice. Myši zároveň hostily i roupy *S. obvelata*, v nichž ale žádné giardie přítomny nebyly.

Výskyt diplomonád v hlísticích je pravděpodobně náhodný, i když jisté indicie – přítomnost prvoků ve střevě hlístice a nikoli jejího hostitele (Graham, 1935), přítomnost prvoků pouze ve dvou ze tří druhů červů ze střeva hostitele a jedinci přisedlí na epitelu střeva červa (Greenberg a Spira, 1972) – napovídají, že se u prvoků vyvinula jistá adaptace k životu ve střevě určitých druhů hlístic.

2.1.4.3 Parabasalia

Výskyt myší střevní trichomonády *Tritrichomonas muris* ve střevech roupů *Aspiculuris tetraptera* a *Syphacia obvelata* z téhož hostitele popisují Theiler a Farber (1936). Trichomonády se hojně vyskytovaly v lumenu střeva roupa *A. tetraptera* a v menší míře i *S. obvelata* („infekce“ *S. obvelata* trichomonádami byly zaznamenány méně často a v menší intenzitě). Myši, které byly v pokusu použity, hostily kromě *T. muris* také další prvoky – *Entamoeba muris*, *Giardia muris*, *Chilomastix bettencourti* a *Eimeria falciformis* – a velmi vzácně byly v roupech nalezeny i první tři z těchto prvoků. Vzhledem k četnosti a intenzitě výskytu *T. muris* v hlísticích oproti ostatním prvokům se tato trichomonáda jeví

být k pobytu ve střevě červa lépe adaptovaná. Trichomonády podstupovaly ve střevě roupa buněčné dělení ve stejné míře, jako ve střevě myši. Roupi hostící trichomonády byli získáni i ze střeva myší, u nichž se nepodařilo prvoky nalézt, což autory vedlo k domněnce, že by přítomnost trichomonád v tělech roupů mohla hrát roli v jejich přenosu na nové hostitele. V larvách však trichomonády pozorovány nebyly. Teorii o přenosu podporuje nález dvou motilních trofozoitů *T. muris* v neporušeném vajíčku *S. obvelata* (Becker, 1933).

Zvláštním případem výskytu trichomonád v tělech hlístic je asociace trichomonády *Histomonas meleagridis* (a *Parahistomonas wenrichi*) a ptačí škrkavky *Heterakis gallinarum*, a dále trichomonády *Dientamoeba fragilis* a roupa *Enterobius vermicularis*. V prvním ze jmenovaných případů je prokázáno, že prvoci jsou prostřednictvím vajíček hlístic přenášeni na nové hostitele. U druhého případu se o možnosti přenosu uvažuje také, ale není definitivně prokázána. Přehledu dosavadních znalostí těchto asociací a dalších faktorů v přenosu jmenovaných trichomonád je věnována kapitola 2.1.5.

2.1.5 Přenos trichomonád hlísticemi na nové hostitele

2.1.5.1 *Histomonas meleagridis*, *Parahistomonas wenrichi* a *Heterakis gallinarum*

Histomonas meleagridis je parazitický prvok z řádu Tritrichomonadida obývající slepé střevo ptactva (hlavně hrabavých). V životním cyklu se objevuje jednak stadium jednojaderného trofozoita s jedním bičíkem v lumenu střeva hostitele, který se ale za určitých podmínek, např. za přítomnosti určitých druhů střevních bakterií (*Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus subtilis*) (Bradley a Reid, 1966), mění na invazní bezbičíkatou améboidní formu, která proniká do střevní sliznice a způsobuje onemocnění histomoniázu. Kromě střevních patologií dochází k rozsevu prvoků krevní cestou, tvorbě jatrných lézí a koagulaci krve v cévách. Mezi vnímavé druhy ptáků patří krocan domácí, jeřábek kanadský, koroptev polní a páv korunkatý (Lund a Chute, 1972a), středně vnímaví k onemocnění jsou perlička kropenatá (Chute a Lund, 1974) a křepelka viržinská (Lund a Chute, 1971). Několik hostitelských druhů je sice k onemocnění málo vnímavých, nicméně jejich význam spočívá v možnosti nosičství *H. meleagridis*; projevy onemocnění jsou u těchto hostitelů mírné nebo žádné, ale mohou nemoc efektivně přenášet na vnímavější druhy. Jedná se o kura domácího (Lund a Chute, 1971; Lund a Chute, 1972a), kachnu domácí (Callait-Cardinal a kol., 2006) a bažanta obecného (Lund a Chute, 1972b). V životním cyklu prvoka se pravděpodobně uplatňuje i odolné stadium

připomínající cystu, jehož tvorba byla indukována *in vitro*; to asi umožňuje přežití v nepříznivých podmínkách (Zaragatzki a kol., 2010) a poskytuje prvokovi alternativní způsob přenosu na nové hostitele přímou cestou.

Přenos *H. meleagridis* je zajištěn především pomocí vektora, ptačí škrkavky *Heterakis gallinarum* ze skupiny Ascarida parazitující ve slepém střevě kurovitých a vrubozobých ptáků. O možné roli *H. gallinarum* v přenosu *H. meleagridis* bylo zpočátku uvažováno díky zdokumentované vysoké koincidenci obou parazitů a jejich výskytu ve shodné části trávicí soustavy hostitele (Graybill, 1921; Graybill a Smith, 1920). Později bylo dokázáno, že k nákaze hostitele dochází po pozření embryonovaných vajíček *H. gallinarum* (Gibbs, 1962). Co se týče studia lokalizace prvoků v tělech škrkavek, u samců byly histomonády nalezeny v lumenu a výstelce střeva a v rozmnožovací soustavě (ve spermatu, vas deferens a semenném váčku). Několik prvoků bylo na řezech červů zachyceno při penetraci z lumenu střeva do střevní stěny, což nasvědčuje tomu, že k průniku do pohlavní soustavy dochází touto cestou. Prvoci by pak při kopulaci mohli být přenášeni na samice. U samic byly histomonády nalezeny ve stěně vaječníku, ve vyvíjejících se oocytech a ve vajíčkách v děloze (Gibbs, 1962). Kromě *H. gallinarum* byly jako vektoři *H. meleagridis* uvažovány i další ptačí škrkavky *Heterakis bonasae* (Davidson a kol., 1978) a *Ascaridia dissimilis* (Norton a kol., 1999), nicméně pokusy neprokázaly, že by se prvok šířil prostřednictvím těchto červů.

Kromě využití vektora byl u *H. meleagridis* prokázán i přímý přenos. Prvoci jsou schopni ve vnějším prostředí na různých materiálech přežívat několik hodin (až 9 hodin v nechlorované vodě a trusu) (Lotfi a kol., 2012), i když dříve byla uváděna kratší doba (Hu a McDougald, 2003). Novější údaj tedy přisuzuje významější roli přímému přenosu *H. meleagridis*. Co se týče cesty nákazy, pak se oproti orální inokulaci střevní formy prvoka (morbidity krůt byla 20%) při experimentálních nákazách krůt ukázala být účinnější rektální inokulace (dosaženo bylo morbidity 65%). Jaterní forma byla shledána neinfekční (Lund, 1956). Vysoké morbidity a mortality hostitelů cestou rektální inokulace bylo dosaženo opakovaně (Hess a kol., 2006; Hu a McDougald, 2003; McDougald a Fuller, 2005) a na základě toho byla navržena hypotéza o možném významu kloakálního pití, neboli „cloacal drinking“ (jev, při kterém jsou částice materiálu transportovány z análního rtu do Fabriciovy burzy a slepého střeva, a dochází tak k imunizaci zvířete proti antigenům z vnějšího prostředí) v přenosu histomoníázy.

V přenosu histomoniázy hraje nezanedbatelnou roli i parateneze raných vývojových stadií škrkavek *H. gallinarum* různými druhy žížal (např. *Lumbricus terrestris*, *Allolobophora caliginosa* a *Eisenia foetida*) (Lund a kol., 1966).

Parahistomonas wenrichi je prvok blízce příbuzný *H. meleagridis* ze slepého střeva krocanů. Je také schopen améboidního pohybu, ale dosahuje větších rozměrů, má 4 bičíky a je pro hostitele nepatogenní. Shodný je i způsob přenosu *P. wenrichi* – na nové hostitele je totiž i tento nepatogenní prvok přenášen vajíčky škrkavky *H. gallinarum* a k nákaze dochází vylíhnutím červa ve střevě hostitele (Fine, 1975; Lund, 1968).

2.1.5.2 *Dientamoeba fragilis* a *Enterobius vermicularis*

Dientamoeba fragilis je protozoární parazit tlustého střeva člověka příslušící i přes svou netypickou morfologii do skupiny Parabasalia do blízké příbuznosti s *Histomonas meleagridis* (Gerbod a kol., 2001). Trofozoiti, jejichž pohyb je améboidní, jsou ve většině případů dvojjaderní díky pozdržení buněčného dělení ve stadiu telofáze. V životním cyklu tohoto prvoka, který je schopen patogenního působení v lidském střevě, doposud figuruje pouze stadium trofozoita a existence odolného stadia nebyla potvrzena (Johnson a kol., 2004). Ve vnějším prostředí trofozoiti nepřežívají déle než několik hodin. Kromě člověka může být údajně hostitelem *D. fragilis* omezené spektrum zvířecích druhů jako makak, pavián, gorila nížinná, ovce (Stark a kol., 2008) nebo prase (Crotti a kol., 2007).

Díky neúspěšným pokusům dosáhnout infekce hostitelů perorální cestou, absenci odolného stadia a příbuznosti s *H. meleagridis* byla vyslovena hypotéza o přenosu vajíčky některé lidské hlístice. Sukanahaketu (1977) pozoroval ve vajíčkách škrkavky *Ascaris lumbricoides* ze stolice pacienta se simultánní nákazou škrkavkou a prvokem tělíska podobná volným trofozoitům *D. fragilis*. Tělíska byla všechna jednojaderná, nebyla nalezena ve vajíčkách škrkavky z pacientů nakažených pouze hlísticí a jejich jádra se vizuálně shodovala s jádry *D. fragilis*. Zatím nebylo potvrzeno, zda se opravdu jednalo o prvoky.

Koincidence *D. fragilis* a lidského roupa *Enterobius vermicularis* často mnohonásobně (až 20x) převyšuje teoretické výpočty (Burrows a Swerdlow, 1956; Girginkardesler a kol., 2008; Melvin a Brooke, 1962; Preiss a kol., 1990; Yang a Scholten, 1977). V řezech samic roupů ze slepých střev pacientů infikovaných i prvokem byla nalezena améboidní tělíska podobná *D. fragilis* ze slepého střeva (Burrows a Swerdlow, 1956). Útvary se vyskytovaly ve 30% vajíček roupů z pacientů s koinfekcí, avšak nikoliv

v roupech z pacientů bez infekce prvokem. Přestože práce neosvětluje, jakým způsobem se domnělí prvoci do vajíček roupů dostali, a pozdější pokusy vykultivovat prvoky z vajíček nepřinesly pozitivní výsledek (Burrows a Swerdlow, 1956; Ockert, 1972a; Yang a Scholten, 1977), nález byl pokládán za nepřímý důkaz přenosu prvoků vajíčky lidského roupa a hypotézu posléze podpořily i další práce. Několikrát se údajně podařilo docílit nákazy člověka prvokem po pozření vajíček roupa z pacientů s nákazou prvokem (Burrows a Swerdlow, 1956; Ockert, 1972b; Ockert, 1975). Přesvědčivý důkaz byl výstupem pokusu, kdy byl srovnáván izoelektrický bod trofozoitů *D. fragilis* z kultury a améboidních tělísek ve vajíčkách roupů na řezech. Výsledky ukázaly, že elektrostatický náboj cytoplasmy a jader v obou vzorcích se téměř shoduje, a pravděpodobně se tedy ve vajíčkách roupa opravdu nachází prvok *D. fragilis* (Ockert a Schmidt, 1976). Naopak existuje několik prací (většinou novějšího data) svědčících proti hypotéze. Například pomocí polymerázové řetězové reakce se nepodařilo zachytit DNA prvoka ve vajíčkách roupů získaných z pacientů s koinfekcí oběma parazity (Menghi a kol., 2005). Při vyšetření 100, respektive 60 pacientů s nákazou *D. fragilis* nebyla nalezena vajíčka roupa ani u jedné z testovaných osob (Kean a Malloch, 1966; Stark a kol., 2005). Vzhledem k rozporuplnosti výsledků o přenosu *D. fragilis* prostřednictvím roupa *E. vermicularis* zůstává téma předmětem debaty (Barratt a kol., 2011).

2.2 Schopnost adheze a invaze u trichomonád

Předpokladem pro přítomnost prvoka v tkáních hlístice nebo definitivního hostitele je schopnost adheze a invaze. Opodstatněnost domněnky, že by se podobně mohla chovat i myši trichomonáda *Tritrichomonas muris* dokládá fakt že vybraní zástupci skupiny Parabasalia tuto schopnost mají. Tato kapitola se zabývá druhy trichomonád s takovými vlastnostmi a shrnuje poznatky o mechanismu adheze a invaze.

2.2.1 *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis je sexuálně přenášený patogen parazitující ve sliznici pohlavní soustavy a močové trubici člověka. Infekce může probíhat asymptomaticky (u určitého procenta žen a téměř vždy u mužů), ale u žen nezdědka dochází k zánětlivým onemocněním pohlavních cest a dalším komplikacím. Během infekce pohlavních cest prvok adhezuje k hostitelským buňkám, což je zásadním krokem v patogenezi onemocnění (Gilbert a kol., 2000).

Co se týče molekulární podstaty interakce s hostitelskými buňkami, ta byla u *T. vaginalis* ze všech „adherujících“ trichomonád popsána asi nejpodrobněji. První překážkou, kterou musí prvok v hostiteli na cestě k epitelu překonat, je mukózní vrstva. V pokusech s trichomonádami na mukózním povrchu bylo prokázáno, že prvoci se nejprve vážou na glykoproteiny v mukusu pomocí adhezivních proteinů podobných lektinům, poté dochází k produkci enzymů rozpouštějících mukus (mucináz, enzymů z rodiny cysteinových proteináz) a uvolnění buněk z vazby na muciny (Lehker a Sweeney, 1999). Parazit poté proniká k buňkám epitelu. Na povrchu buněk trichomonád byly nalezeny 4 typy molekul zprostředkovávajících adhezi (adhezínů) – AP65, AP51, AP33 a AP23 (Arroyo a kol., 1992). Adheziny na povrchu parazita jsou chráněny proteiny z rodiny cysteinových proteináz, a adheziny se tedy stávají funkčními až po "odmaskování" enzymatickou degradací jinými proteinázami na povrchu parazita (Arroyo a Alderete, 1989). Po odmaskování adheziny zprostředkují přichycení na vaginální epiteliální buňky a buňky trichomonád se začínají měnit v améboidní formy (Arroyo a kol., 1993). Prvoci se prodlužují a tvoří filopodie a pseudopodie, které vysílají mezi hostitelské buňky a maximalizují tak plochu kontaktu.

2.2.2 *Trichomonas gallinae*

Trichomonas gallinae je patogenní zástupce řádu Trichomonadida parazitující u mnoha druhů ptáků včetně těch, kteří jsou chováni v zajetí (např. u holubů, kde je parazit vysoce patogenní), a tudíž má ekonomický význam. Trofozoiti se vyskytují v ústní dutině, jícnu, voleti a trachei, kde způsobují zánětlivé léze a mohou diseminovat i do dalších orgánů. Nejnáchylnější jsou mladí ptáci, u nichž nákaza často končí smrtí. Pomocí skenovacího elektronového mikroskopu byla zdokumentována adheze *T. gallinae* na epitel v horní části jícnu a v ústní dutině nakažených holubů. Trichomonády na sliznici tvoří morfologickou formu zvonovitého tvaru s jednou velkou zvlněnou panožkou v kontaktu s epitelem a později se mění na formu kolumnárního tvaru s panožkou bez zvlnění, ale s množstvím vybíhajících menších pseudopodií (Kietzmann, 1993). Tyto adherující buňky pravděpodobně enzymaticky způsobují patologické změny a deskvamaci buněk epitelu. Pomocí molekulární analýzy bylo prokázáno, že v genomu *T. gallinae* se nachází gen pro adhezivní protein s vysokou homologií (až 94,2 %) s genem pro adhezivní protein AP33 tří kmenů *Trichomonas vaginalis* (Luo a kol., 2010).

2.2.3 *Tritrichomonas foetus*

Tritrichomonas foetus je ekonomicky významný původce sexuálně přenosného onemocnění dobytka způsobující patologie u samic (záněty v pohlavní soustavě, potraty až neplodnost). *T. foetus* je prvok identický s *Tritrichomonas suis*, komenzálem ze střeva prasat (Tachezy a kol., 2002). Patogeneze onemocnění opět zahrnuje adhezi prvoka ve formě, která vytváří pseudopodie k epitelům rozmnožovacího traktu nakažených krav, což bylo popsáno mnoha autory pomocí skenovací elektronové mikroskopie (Midlej a kol., 2009) a dalších technik (Corbeil a kol., 1989). Je známo, že prvoci se vážou na glykoproteiny chránící epitel hostitele pomocí enzymatického komplexu, který má navíc schopnost štěpit vazby mezi kyselinou sialovou a sacharidy, a uvolňovat tak cestu parazita k epitelu (Babal a Russell, 1999). Na povrchu buněk trichomonády se dále vyskytuje adhezivní proteinový komplex Tf190, který má úlohu v adhezi prvoka k epiteliálním buňkám (Burgess a McDonald, 1992; Shaia a kol., 1998).

2.2.4 *Histomonas meleagridis*

Histomonas meleagridis je trichomonáda schopná invaze hostitelských tkání. Morfologie a vývoj *H. meleagridis* ve tkáních hostitele byla popsána pomocí světelné a elektronové mikroskopie (Lee a kol., 1969). V lumeny střeva hostitelského ptáka se prvok vyskytuje v morfologické formě s jedním bičíkem. Mění se na invazivní stadium s améboidní morfologií a internalizovaným bičíkem, pomocí pseudopodií proniká mezi epiteliálními buňkami a fagocytyje materiál ze svého okolí. Invazivní stadium se poté mění na nepohyblivé vegetativní stadium kulovitého tvaru se zásobami glykogenu a ležící pasivně mezi hostitelskými buňkami. Toto stadium je pravděpodobně totožné se stadiem prvoků nalézaným v játrech, kam se histomonády šíří hematogenním rozsevem portální žilou.

V přenašeči (ptačí škrkavce *Heterakis gallinarum*) prvok proniká střevní stěnou ve formě invazního typu podobného tomu, který byl popsán ve slepém střevě u ptáků (Gibbs, 1962). U samic se prvok dostává do germinální zóny vaječníku, kde je lokalizován extracelulárně, fagocytyje a dělí se. Dále se parazit pohybuje sestupně vaječníkem a aktivně penetruje oocyty, ve kterých se dále živí fagocytózou. Stadia prvoků postupující vaječníkem škrkavky jsou podobné tkáňovým stádiím ze střeva ptáka, avšak jsou menších

rozměrů (Lee, 1969). Ve vajíčkách v děloze pak mají prvoci zvětšené jádro a redukovanou cytoplasmu (Gibbs, 1962). U samců se prvok dostává do varlat, kde je buňka prvoka poměrně velkého rozměru a vykazuje améboidní morfologii, a poté postupuje do vas deferens, zmenšuje se a zakulacuje. Tyto malé, méně aktivní formy neobsahují potravní vakuoly (Lee, 1971). Typické buněčné struktury jako parabazální aparát a kinetosomy jsou zachovány napříč všemi morfologickými stadii.

Použitím primerů pro geny kódující adheziny AP65 a AP33 u *Trichomonas vaginalis* bylo zjištěno, že v genomu *H. meleagridis* se pravděpodobně vyskytuje několik genů pro homology těchto adhezínů (Mazet a kol., 2007). Proteiny kódované těmito geny by mohly sloužit k adhezi k hostitelským buňkám podobným mechanismem, jako je to známo u *T. vaginalis*. Podrobnější informace o molekulární podstatě mechanismu adheze však doposud nejsou známy.

2.2.5 *Cochlosoma anatis*

Odlišný způsob adheze využívá morfologicky poněkud atypický zástupce skupiny Trichomonadida, ptačí parazit *Cochlosoma anatis*. Tento parazit ze střeva kachen a hus má v přední části buněčného těla vyvinutý adhezivní disk odvozený od mikrotubulů pelty a cytoskeletární struktury kosty sloužící k přichycení na mukózu střeva hostitele. Tento disk vizuálně připomíná přichytný disk diplomonád rodu *Giardia*, nicméně jak morfologické (Pecka a kol., 1996), tak molekulárně fylogenetické studie (Hampl a kol., 2006) prokázaly příslušnost prvoků ke skupině Parabasalia, řádu Trichomonadida.

2.3 Roupi a střevní trichomonády myši domácí

Na závěr literárního přehledu budou detailněji představeny dvě skupiny parazitů z trávicího traktu myši domácí (*Mus musculus*) - hlístice z řádu Oxyurida a střevní bičíkatí prvoci ze skupiny Parabasalia.

2.3.1 Oxyurida

Ve střevě myši domácí nalézáme dva zástupce řádu Oxyurida, *Syphacia obvelata* a *Aspiculuris tetraptera*. Co se týče biologie i morfologie obou druhů myších roupů, nalézáme znaky shodné (jednoduchý životní cyklus bez mezihostitele, přítomnost 3 pysků a hltanu oxyuroidního typu s dobře vyvinutým bulbem), ale i odlišnosti (viz níže). Smíšené infekce oběma druhy roupů jsou běžné (Bazzano a kol., 2002).

2.3.1.1 *Syphacia obvelata*

Dospělci *Syphacia obvelata* se vyskytují především ve slepém střevě a v menší míře i v tlustém střevě hostitele, kterým může být myš, další hlodavci a vzácně i člověk (Riley, 1919). Gravidní samice migrují ze slepého střeva do perianální oblasti, kde kladou vajíčka a umírají (Chan a Kopilof, 1958). Vajíčka se zde za několik hodin (5-20) stávají infekční a jejich požitím dochází k nákaze dalšího hostitele. Larvy se líhnou v tenkém střevě, odkud migrují do slepého a tlustého střeva, kde dospívají. V životním cyklu roupa se uplatňuje i retroinfekce, kdy vylíhnuté larvy migrují z anu zpět do střeva (Prince, 1950). Životní cyklus trvá 11-15 dní.

Nejvíce parazitovány jsou mladé myši do 3 měsíců, zatímco myši ve věku od 4 do 9 měsíců vykazují určitou rezistenci k infekci (Panter, 1969). Infekce roupem *S. obvelata* probíhají zpravidla bezpříznakově, i když v některých případech (Kumar a kol., 2004) došlo při infekci *S. obvelata* u hostitele k rektálnímu prolapsu, nebo byla dokumentována zácpa a další střevní patologie. V těchto případech však nebyly vyloučeny další příčiny onemocnění.

2.3.1.2 *Aspiculuris tetraptera*

Dospělci *Aspiculuris tetraptera* se vyskytují především v tlustém střevě hostitele (méně ve slepém střevě), a to v jeho proximální části, odkud gravidní samice migrují do distální části tlustého střeva, kde kladou vajíčka. Vajíčka opouští hostitele spolu s trusem a stávají se infekční za 6 dní. Poté jsou požit novým hostitelem, larvy se líhnou ve slepém střevě, během osmi dní migrují do distální části tlustého střeva a zpět do proximální části, kde

dospívají (Chan, 1955). Během vývoje (prvních 6 dní po infekci) se larvy vyskytují v Lieberkühnových kryptách tlustého střeva, tubulárních žlázkách vyskytujících se v podobě krypt mezi střevními klky, poté krypty opouští (v L3 stadiu) a vrací se do lumenu střeva (Behnke, 1974).

Experimenty s nákazou různě starých myší ukázaly, že s věkem klesá vnímavost myší k infekci (Stahl, 1961). Nejvíce červů bylo nalezeno u 3 měsíce starých myší a počty červů rovnoměrně klesaly až do věku 10 měsíců, poté se již výrazně neměnily. Ze stejné studie vyplývá, že silněji parazitováni jsou samci oproti samicím – u dospělých samic bylo nalézáno poloviční množství červů. Ani *A. tetraptera* není považován za patogena.

Jak bylo zmíněno výše, mezi oběma druhy myších roupů existují odlišnosti v jejich biologii (např. v průběhu životního cyklu), ale i rozdíly morfologické, na jejichž základě je možné jednotlivé druhy od sebe odlišit. Tyto odlišnosti jsou shrnuty v tabulce č. 1.

Tab.1: Morfologické rozdíly roupů *S. obvelata* a *A. tetraptera*. Upraveno podle Taffs (1976).

	<i>Syphacia obvelata</i>	<i>Aspiculuris tetraptera</i>
Samec		
Délka	1,3 – 1,6 mm	2 – 2,6 mm
Šířka	0,11 – 0,13 mm	0,15 – 0,17 mm
Samice		
Délka	4 – 6 mm	2,6 – 4,7 mm
Šířka	0,11 – 0,27 mm	0,19 – 0,25 mm
Vajíčko		
Velikost	100 – 142 x 30 – 40 µm	90 x 41 µm
Tvar	Asymetrický, ledvinovitý	Téměř podélně symetrický, vřetenovitý
Obsah	Larva	Morula
Cervikální křídla	Málo vyvinuta	Výrazná a široká, ostře končící za úrovní hltanového bulbu
Hltan	Kyjovitý s kulovitým bulbem	Kyjovitý s oválným bulbem
Vulva	V 1/7 délce těla	Na konci 1/3 těla
Spikuly a gubernakulum	1 výrazná spikula, gubernakulum vyvinuto	Nejsou přítomny
Zakončení těla	Protáhlé, špičaté	Kuželovitého tvaru

2.3.2 Parabasalia

Ve střevě myši domácí se v našich podmínkách s různou frekvencí vyskytuje několik zástupců trichomonád. Rod *Tritrichomonas* reprezentují dva zástupci – *Tritrichomonas muris* a *Tritrichomonas minuta*, dále nacházíme po jednom zástupci rodů *Hexamastix* a *Pentatrichomonas* - *Hexamastix muris* a *Pentatrichomonas hominis*.

2.3.2.1 *Tritrichomonas muris*

Tritrichomonas muris je velmi běžný nepatogenní obyvatel střeva myši, křečka, krysy a dalších hodavců, např. myšice (Čepička, 2006). Vyskytuje se hlavně ve slepém střevě, ale v menší míře i v tlustém a tenkém střevě hostitele. Trofozoit, který měří 16 – 26 µm na délku a 10 – 14 µm na šířku, má tři přední bičíky, zpětný bičík spolutvořící bohatě zvlněnou undulující membránu podloženou silnou kostou a ostře zakončený trubicovitý axostyl (Flynn, 2007).

Infekční stadium sloužící k přenosu na nové hostitele je pseudocysta kulovitěho tvaru, která se vytváří z trofozoita přes přechodné stadium a je charakterizovaná internalizovanými bičíky i undulující membránou (Koyama a kol., 1987). O heterogenitě pseudocyst *T. muris* hovoří studie, která popisuje morfologické změny pseudocyst během jejich stárnutí (Stachan a kol., 1984). Jen mladé pseudocysty jsou infekční pro nového hostitele, zatímco starší, tmavé a zvětšené pseudocysty nejsou výsledkem zrání, jak se domnívali jiní autoři, ale jsou výsledkem degenerativního procesu končícího lýzou buňky. Pseudocysty jsou nejen infekčním stadiem, ale vznikají pravděpodobně i v reakci na stres a jejich vznik je možné vyvolat změnou vnějších podmínek, což potvrzují studie zabývající se tvorbou pseudocyst u příbuzných trichomonád, *Tritrichomonas foetus* a *Trichomonas vaginalis* (Granger a kol., 2000; Mariante a kol., 2004; Pereira-Neves a kol., 2003). Tvorba pseudocyst je proces do jisté míry vratný, jak dokládají práce, kdy autoři pozorovali konverzi pseudocyst *T. muris* nalezených ve střevě (Jelen, 1954) a trusu (Mattern a Daniel, 1980) křečka zlatého na plně motilní trofozoity.

2.3.2.2 *Tritrichomonas minuta*

Tritrichomonas minuta je prvok žijící ve slepém a tlustém střevě myší, křečků a krys. Od *T. muris* se liší především velikostí, dosahuje totiž pouze zhruba 4 – 9 µm na délku a 2 – 5 µm na šířku. Zvlnění undulující membrány *T. minuta* je oproti membráně *T. muris* pozvolnější a liší se ultrastrukturou na příčném řezu (Brugerolle, 1981). O biologii tohoto prvoka není mnoho známo, předpokládá se, že je podobná *T. muris* (Flynn, 2007).

2.3.2.3 *Hexamastix muris*

Hexamastix muris je dalším běžným obyvatelům slepého střeva myší a jiných hlodavců. Dosahuje délky 5 - 12 µm, má 5 předních bičíků a jeden vlečný, který na rozdíl od ostatních popisovaných trichomonád netvoří undulující membránu a není podložen kostou. Prvok je považován za nepatogenního (Flynn, 2007).

2.3.2.4 *Pentatrichomonas hominis*

Pentatrichomonas hominis je nepatogenní trichomonáda obývajícím slepé a tlusté střevo nejen myší, krys a křečků, ale i široké škály dalších savců, jako jsou psi, kočky, dobytek, primáti nebo člověk. Trofozoiti dosahují délky 7-12 µm, mají 5 předních bičíků a jeden zpětný tvořící undulující membránu. Axostyl je na rozdíl od axostylu *Tritrichomonas muris* a *Tritrichomonas minuta* štíhlejší, s pozvolným zakončením (Flynn, 2007).

Z uvedeného přehledu je zřejmé, že interakce hlístic a mikroparazitů nejsou ojedinělým fenoménem. Mikroparaziti jsou v některých případech dobře přizpůsobeni k pobytu v těle hlístice. Prvoci určitých druhů jsou schopni invadovat tkáň hlístice a využívat své přítomnosti zde k přenosu na nové hostitele.

3 CÍLE PRÁCE

Práce se zabývá výskytem myších trichomonád v tělech myších roupů. Cílem pokusů bylo nahlédnout blíže na interakci a pokusit se zjistit, zda jsou trichomonády přítomné v tělech roupů za účelem přenosu na nové hostitele. Konkrétní cíle práce jsou:

- 1) Zdokumentovat přítomnost myších trichomonád ve střevě myších roupů pomocí vhodného histologického barvení s ohledem na co možná nejlepší znázornění morfologických struktur trichomonád.
- 2) Pomocí vhodných technik (chromogenní *in situ* hybridizace) určit lokalizaci trichomonád v tělech roupů, zaměřit se jejich případný výskyt mimo střevo roupů.
- 3) Determinovat druh/druhy prvoků přítomných v roupech za pomoci molekulárních technik (sekvenací genu pro RNA malé ribozomální podjednotky) a transmisní elektronové mikroskopie (na základě ultrastrukturních znaků). Vypracovat fylogenetickou analýzu nově získaných sekvencí.
- 4) Pomocí transmisní elektronové mikroskopie popsat, zda dochází k interakci trichomonád se střevním epitelem roupů, zda se prvoci dělí, případně popsat další pozorované procesy.
- 5) Na základě získaných výsledků zhodnotit význam interakce trichomonád a roupů pro přenos prvoka na nové hostitele (myš).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Pitvy

Vyšetřované myši byly outbredních kmenů a pocházely z různých chovných zařízení z oblasti Prahy. Myši byly usmrceny cervikální dislokací. Po otevření břišní dutiny byla nejprve sterilně odebrána trávenina ze slepého střeva určená na izolaci DNA. Poté byl pomocí světelného mikroskopu vyšetřen vzorek tráveniny na přítomnost střevních trichomonád a pozorovaná intenzita infekce byla zaznamenána (viz kap. 4.1.1.1). Dále bylo z břišní dutiny myši vyňato slepé a tlusté střevo. Obě části byly podélně rozstříženy a z jejich obsahu byli vybráni pokud možno všichni jedinci roupů. Roupí byli dále pod lupou roztrženi do druhů podle morfologických kritérií shrnutých v tab. 1 a pomocí světelného mikroskopu bylo pozorováno, zda-li jsou v jejich střevech přítomny trichomonády. Počty roupů jednotlivých druhů a intenzita výskytu trichomonád ve střevě roupů byly zaznamenány (viz kap. 4.1.1.2). Pozitivní roupí byli fixováni pro účely klasické histologie, *in situ* hybridizace, transmisní elektronové mikroskopie nebo byli opláchnuti pufrům a destilovanou vodou a zamrazeni pro pozdější izolaci DNA.

4.1.1 Odečítání intenzity infekce trichomonádami

4.1.1.1 Odečítání intenzity infekce trichomonádami z obsahu slepého střeva

Na podložním skle bylo v jedné kapce trisového pufru (150 mM NaCl, 20 mM TRIS, pH 7,8) rozmícháno množství tráveniny o velikosti špendlíkové hlavičky a směs byla přikryta krycím sklem. Preparát byl ihned umístěn pod světelný mikroskop a pozorován. Pozorovaná intenzita infekce byla zařazena do jedné z kategorií (viz tab. 2).

Tab. 2: Stanovení kategorií pro odečítání intenzity infekce trichomonádami.

Intenzita infekce	Popis pozorování
Bez infekce	Trichomonády nejsou přítomny.
Slabá	V zorném poli se pohybují jednotlivé buňky trichomonád, je třeba je v preparátu vyhledávat.
Střední	Přítomnost trichomonád je sice patrná na první pohled, ale buňky nezaplní většinu zorného pole. Stav nezařaditelný ani do jedné z kategorií intenzity infekce Slabá a Silná.
Silná	Zorné pole je zaplněné pohybujícími se buňkami trichomonád.

4.1.1.2 Odečítání intenzity výskytu trichomonád ve střevě myších roupu

Roupi získaní z tráveniny byli umístěni na podložní sklo do trisového pufru a pod světelným mikroskopem byl pozorován počet trichomonád přítomných ve střevě. V případě nutnosti (byl-li roup špatně natočen nebo příliš motilní) bylo použito krycího skla, ale při takovém postupu hrozilo poškození rouna, a proto nebyl používán standardně. Intenzita výskytu trichomonád byla u každého rouna byla zařazena do jedné z kategorií (viz tab. 3) a do laboratorního deníku byl zaznamenán takový stav, který byl pozorován u většiny rounů (u všech rounů v případě kategorie Bez infekce) jednoho druhu ze střeva jedné myši.

Tab. 3: Stanovení kategorií pro odečítání intenzity výskytu trichomonád ve střevě myších rounů.

Intenzita výskytu	Popis pozorování
Bez infekce	Trichomonády nejsou přítomny.
Slabá	V celém střevě pozorujeme pouze ojedinělé buňky trichomonád.
Střední	Trichomonády jsou přítomny, ale nezaplňují většinu prostoru střeva. Stav nezařaditelný ani do jedné z kategorií intenzity infekce Slabá a Silná.
Silná	Střevo rouna je zcela nebo téměř zcela zaplněné buňkami trichomonád.

4.2 Barvení klasickými histologickými technikami

4.2.1 Fixace

Pro fixaci materiálu byla použita Bouinova fixáž (Sigma). Zde byly vzorky ponechány do druhého dne (16 až 24 hodin), a poté byla fixáž odstraněna a materiál vypírán 70% etanolem až do úplného zbělení vzorku.

4.2.2 Zalévání do JB-4 média

JB-4 (Sigma) je glykolmetakrylátová pryskyřice používaná v histologii, která díky své rozpustnosti ve vodě nevyžaduje odvodňování vzorku před infiltrací, a po ztuhnutí a nakrájení bločku je možné řezy ihned (bez zavodňování) barvit. Toto zalévací médium jsme zvolili proto, že z hlediska velikosti rounů a tvrdosti jejich kutikuly by při použití parafínu hrozilo vypadávání objektů z média při zhotovování histologických řezů.

Použité chemikálie

- Bouinova fixáž (Sigma)
- 70% etanol
- Infiltrační roztok JB-4
 - monomer A 25 ml
 - benzoyl peroxid 0,3125 g
- Polymerační roztok JB-4 - infiltrační roztok JB-4 1ml
 - akcelerátor polymerace 40 μ l

Postup

Pozitivní roupi byli po dobu 16-24 hodin fixováni v 1,5 ml Bouinovy fixáže. Fixace probíhala v pokojové teplotě. Po uplynutí požadované doby fixace byla fixáž odstraněna a vymývána 70% etanolem až do úplného zbělení vzorku.

Vzorky byly vloženy do infiltračního roztoku JB-4 připraveného podle příloženého protokolu výrobce, a to smícháním složek monomeru A a benzoyl peroxidu v uvedeném poměru. Infiltrační roztok byl 3krát po 1,5 hodině vyměněn. Infiltrace probíhala při pokojové teplotě a vzorky byly pro lepší pronikání roztoku umístěny do laboratorní třepačky. Prodloužení doby infiltrace (ponechání vzorků v druhé lázni přes noc) nepřineslo zvýšení kvality vzorku. Infiltrovaný roupi byli přemístěni do želatinové kapsle a zaliti polymeračním roztokem, který byl připraven přidáním výrobcem určeného množství akcelerátoru k poměrnému množství infiltračního roztoku. Před uzavřením kapsle byli roupi orientováni do požadované pozice (podle toho, zda bylo záměrem zhotovit příčné či podélné řezy), kapsle byla uzavřena a ponechána bez přístupu vzduchu nejméně přes noc. Ze zpolymerovaného vzorku byla skalpelem odstraněna kapsle a bloček byl nařezán na mikrotomu (Finesse ME, Shandon Scientific Limited) pomocí skleněných nožů. Optimální tloušťka řezů byla stanovena na 2,5 μ m. Při této tloušťce bylo možné úspěšně přenést vysoké procento řezů na kapku destilované vody na podložním skle, a zároveň se tato tloušťka ukázala být dostačující pro pozorování obarvených řezů pod mikroskopem a zhotovení kvalitních obrázků. Řezy byly ponechány na podložním skle na plotýnce při cca 50 °C a zaschlé řezy byly do 14 dnů obarveny. Při barvení po delší době by hrozilo zoxidování řezů a zkreslení výsledku barvení.

4.2.3 Barvení

4.2.3.1 Hematoxylin-eosin

Barvení hematoxylinem-eosinem patří mezi základní histologická barvení. Na preparátu po obarvení pozorujeme bazofilní struktury (např. buněčné jádro) v modrých odstínech, acidofilní struktury (např. buněčná cytoplazma) v odstínech červené a růžové. Použit byl Ehrlichův kyselý hematoxylin.

Složení Ehrlichova kyselého hematoxylinu:

- destilovaná voda – 100 ml
- glycerín – 100 ml
- 96% etanol – 100 ml
- ledová kyselina octová – 10 ml
- hematoxylin (Polysciences, Inc.) – 2 g
- síran hlinito-draselný ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$) – 3 g
- jodičnan sodný NaIO_3 – 0,4 g

Použité chemikálie:

- Ehrlichův kyselý hematoxylin
- eosin (Polysciences, Inc.) 1% v destilované vodě
- destilovaná voda

Postup barvení

- Ehrlichův kyselý hematoxylin – 4 minuty
- opláchnutí sklíček destilovanou vodou do zmodrání řezů
- eosin – 2 minuty
- opláchnutí destilovanou vodou, zaschnutí
- montování do DPX média (Mountant for histology, Sigma)
- zalakování sklíček

4.2.3.2 Giemsa

Giemsovo barvivo obsahuje několik dílčích barviv: methylenovou modř, eosin a azur –B. Při použití této techniky jsou bazofilní struktury obarvené v odstínech fialové, červené a růžové, acidofilní struktury se barví modře. Pro barvení Giemsou byl využit komerčně dodávaný roztok (Sigma).

Použité chemikálie

- zásobní roztok Giemsy (Sigma)
- destilovaná voda

Postup barvení

Zásobní roztok byl naředěn destilovanou vodou v poměru 1:19 a nanesen na sklíčka s řezy. Po 25 minutách byla sklíčka opláchnuta proudem destilované vody a poté nechána oschnout. Následně byly řezy zamontovány do DPX média a sklíčka zalakována.

4.2.3.3 Leeho barvení methylenovou modří a bazickým fuchsinem

Barvení methylenovou modří a bazickým fuchsinem patří mezi běžná barvení tkáňových řezů. Na obarvených řezech můžeme pozorovat jádra obarvená modře, cytoplasmu a bičíky v odstínech růžové, většinu buněčných granul fialově až modře.

Použité chemikálie

- | | |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| - zásobní roztok methylenové modři | - methylenová modř (Lachema) 0,5 g |
| | - destilovaná voda 400 ml |
| - zásobní roztok bazického fuchsinu | - bazický fuchsin (National aniline division) 0,5 g |
| | - destilovaná voda 400 ml |
| - zásobní roztok 0,1 M fosfátového pufru, pH 6,8 | |
| - 96% etanol | |
| - destilovaná voda | |

Postup barvení

- barvení řezů 30 sekund roztokem o složení:
 - zásobní roztok methylenové modři 12 ml
 - zásobní roztok bazického fuchsinu 12 ml
 - zásobního roztoku 0,1 M fosfátového pufru 21 ml
 - 95% etanolu 15 ml
- opláchnutí destilovanou vodou
- ponoření do 96% etanolu na 1 – 2 sekundy za účelem odstranění pozadí
- opláchnutí destilovanou vodou
- oschnutí, montování do DPX média, zalakování

4.3 Stříbření AgNO_3

Stříbření nitrátem stříbra se používá k vizualizaci bičků, například u nálevníků. My jsme se tímto způsobem pokoušeli obarvit bičíky trichomonád na histologických řezech. Fixace a krájení vzorků probíhala stjeným způsobem, jako u barvení klasickými histologickými technikami (viz kap. 4.2).

Použité chemikálie

- 5% AgNO_3 v destilované vodě

Postup barvení

Na podložní sklo s histologickými řezy byl na 30 minut nanesen roztok AgNO_3 . Poté byl roztok z řezů odstraněn a řezy ponechány pod lampou (UV záření po 1 hodinu); řezy byly následně zamontovány do DPX montovacího média (Sigma).

4.4 Barvení protargolem podle Bodiana

Technika barvení protargolem podle Bodiana se používá pro obarvení morfologických struktur (bičíky, mikrotubulární struktury, jádro, cytoplasma) bičíkatých prvoků a také nervových vláken v histologii. Díky fixaci za vlhka je zachováno vzájemné postavení organel jako v nativním stavu a barvení protargolem je tak základní technikou pro druhovou determinaci bičíkatých prvoků. Postupovali jsme podle Nieho protokolu z roku 1950. V této práci byly barveny protargolem jednak nátěry tráveniny ze slepého střeva dvou myší, jednak histologické řezy rousů *Symphysa obvelata* z těch samých myší (po dvou samicích z jedné myši, celkem 4 samice) fixovaných v Bouinově fixáži (viz kap. 4.2.1), zalitých v JB-4 médiu (viz kap. 4.2.2) a nakrájených na tloušťku 2, 4, 6, 8 a 10 μm zaschlých na krycím skle. Pro barvení histologických řezů byl uplatněn pracovní postup až od bodu 3.

Použité chemikálie:

- Bouin-Hollandova fixáž (chemikálie: kyselina pikrová 4 g, octan měďnatý 2,5 g, formaldehyd 40% 10 ml, ledová kyselina octová 1,5 ml, destilovaná voda do 100 ml. Postup: rozpustit octan měďnatý ve vodě, pomalé přidávání kyseliny pikrové, doplnění vody do 100 ml, před použitím přidání kyseliny pikrové do finální koncentrace 5%)
- etanol 50%, 70%, 80%, 96%, 100%
- destilovaná voda, vodovodní voda
- KMnO_4 0,5%
- kyselina oxalová 2%, 5%
- protargol 1%
- redukční roztok – hydrochinon 1%, Na_2SO_3 5%
- AuCl_3 1%
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 5%
- karbolxylol
- xylen
- DPX montovací médium (Sigma)

Postup

- 1) Nátěr. Trávenina byla smíchána v poměru 1:1 s Ringerovým roztokem s příměsí bílku a 1 μ l směsi byl nakápnut na okraj krycího sklíčka a jedním pohybem rozetřen ke druhému okraji.
- 2) Fixace za vlhka. Sklíčko s čerstvým nátěrem bylo ihned zlehka položeno na hladinu Bouin-Hollandovy fixáže v Petriho misce (fixovaným materiálem dolů) a po 2 minutách bylo ponořeno na dno misky nátěrem vzhůru. Takto byl preparát ponechán několik hodin.
- 3) Převedení do 70% etanolu. Krycí sklíčka byla upevněna do polyethylenové svorky se zářezem a na svorce byla označena orientace nátěru. Preparát byl postupně ponořen do jedné lázně 50% etanolu a tří lázní 70% etanolu. Zde zůstaly do dalšího zpracování.
- 4) Převedení do destilované vody. Sklíčka byla přes jednu lázeň 50% etanolu převedena do destilované vody.
- 5) Lázeň v 0,5% KMnO_4 po dobu 5 minut.
- 6) Opláchnutí v destilované vodě, 5x po 30 sekundách. Lázeň v 5% kyselině oxalové po dobu 5 minut.
- 7) Opláchnutí v destilované vodě, 5x po 30 sekundách.
- 8) Impregnace protargolem. Na dno kádinky byl umístěna spirála měděného drátu a kádinka byla naplněna 1% roztokem protargolu (připravený samovolným rozpuštěním protargolu na hladině destilované vody). Do roztoku byly naskládány preparáty a mezi ně umístěny tenké měděné drátky. Barvení probíhalo 48 hodin při 37 °C.
- 9) Opláchnutí v destilované vodě, 2x po 5 sekundách.
- 10) Lázeň v čerstvě připraveném redukčním roztoku po dobu 5 minut
- 11) Opláchnutí v destilované vodě, 5x po 30 sekundách.
- 12) Lázeň v 1% AuCl_3 s několika kapkami kyseliny octové po dobu 5 minut.
- 13) Opláchnutí v destilované vodě, 2x po 5 sekundách.
- 14) Lázeň v 2% kyselině oxalové po dobu 5 minut.
- 15) Opláchnutí v destilované vodě, 5x po 30 sekundách.
- 16) Lázeň v 5% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ po dobu 10 minut.
- 17) Propírání v tekoucí vodovodní vodě 15 – 20 minut.
- 18) Převedení do xylenu. Preparáty byly vzestupnou alkoholovou řadou (50%, 70%, 80%, 96% a 100% etanol) převedeny do xylenu.
- 19) Montování na podložní skla DPX montovacího média.

4.5 Příprava vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM)

Roupi, v jejichž střevech byl pozorován výskyt trichomonád, byli za účelem determinace druhu, studia biologie a sledování případných dalších lokalizací v těle rousa zpracováni pro transmisní elektronovou mikroskopii. Vzhledem k nízké propustnosti kutikuly rousů byly v základním postupu provedeny dvě změny. Zaprvé byl po půl hodině fixace rousům pomocí žiletky uříznut proximální a distální konec, zadruhé byla zvýšena koncentrace glutaraldehydu ve fixačním roztoku z 2,5% na 5% (Mehlhorn a Harder, 1997). Tímto způsobem bylo dosaženo optimálního nafixování, odvodnění a prosycení vzorku pryskyřicí.

Použité chemikálie

- 5% glutaraldehyd v 0,1 M kakodylátovém pufru (Sigma)
- 0,1 M kakodylátový pufr
- oxid osmičelý (OsO_4), 1-2%
- etanol – 30%, 50%, 70%, 80%, 96%, 100%
- aceton – 100%
- zalévací pryskyřice Spurr

Postup zalévání rousů do pryskyřice Spurr

- fixace – 5% glutaraldehyd v 0,1 M kakodylátovém pufru, 30 minut, pokojová teplota
- uříznutí proximálního i distálního konce červa pomocí žiletky pro lepší pronikání fixáže
- fixace – 5% glutaraldehyd v 0,1 M kakodylátovém pufru, 2 hod, pokojová teplota
- 3x propláchnutí v 0,1 M kakodylátovém pufru
- postfixace – 1 – 2% oxid osmičelý, 1 hod, pokojová teplota
- 3x propláchnutí v 0,1 M kakodylátovém pufru
- odvodnění - 30% etanol, 15 minut
 - 50% etanol, 15 minut
 - 70% etanol, 15 minut
 - 80% etanol, 5 minut
 - 96% etanol, 5 minut

- 3x 100% etanol po 5 minutách
- 3x 100% aceton po 10 minutách
- prosycení směsí aceton: pryskyřice Spurr
 - 3:1, 2 hodiny
 - 1:1, 4 hodiny
 - 1:3, 12 hodin
- prosycení čistou pryskyřicí – 3x 12 hodin
- zalití červa do ploché silikonové formičky a jeho orientace
- tvrdnutí bločku v píce při 60 °C, 48 hodin

K dalšímu zpracování byly vzorky předány do laboratoře elektronové mikroskopie. Zde probíhalo krájení ultratenkých řezů na ultramikrotomu (Reichert-Jung Ultracut E), kontrastování řezů 2-3% vodným roztokem uranylacetátu (20 minut až 1 hodina, tma, etanolová atmosféra) a citrátem olovnatým (podle Reynoldse, 1963, 20 minut, atmosféra bez CO₂). Následně byly řezy prohlíženy pomocí transmisního elektronového mikroskopu TEM JEOL 1011. Z každého zpracovávaného roupa byly zhotoveny řezy v úrovni přední a střední části střeva v souladu s pozorováním, že v těchto oblastech bylo přítomno největší množství prvoků.

4.6 Chromogenní *in situ* hybridizace (CISH)

Metoda CISH byla použita *in situ* za účelem vizualizace trichomonád na histologických řezech pozitivních roupů, tedy takových, v jejichž střevě byly pozorovány trichomonády. K *in situ* hybridizaci byla použita oligonukleotidová sonda značená digoxigeninem, která je specifická pro část genu pro 18S rRNA všech trichomonád, u nichž je známá sekvence tohoto genu (Mostegl a kol., 2010). Roupí byli fixováni, zaliti do JB-4 média, a následně byly vzorky nakrájeny na mikrotomu. Dále byla provedena proteolýza, inkubace s hybridizační směsí obsahující značenou sondu a inkubace s protilátkou proti digoxigeninu konjugovanou s enzymem alkalickou fosfatázou. Poté byla navázaná sonda vizualizována díky reakci BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfátu) jako substrátu pro alkalickou fosfatázu, a NBT (nitrotetrazoliové modři), při které se NBT redukuje na modrofialový nerozpustný diformazan. Tímto způsobem je možné odečíst přítomnost trichomonád v jakýchkoliv tkáních roupa bez ohledu na to, v jakém morfologickém stadiu se prvok nalézá. Vycházeli jsme z protokolu pro chromogenní *in situ* hybridizaci na parafínových řezech (Chvala a kol., 2006), který byl postupně pro účely této práce optimalizován. Během

optimalizace protokolu byly vyzkoušeny různé varianty postupu. Optimálního výsledku bylo dosaženo při přípravě vzorků pro hybridizaci za použití fixáže 7% pufrovaného formaldehydu (oproti Bouinově fixáži) a JB-4 zalévacího média (oproti LR White médiu). Pro proteolýzu se lépe osvědčil pepsin nežli proteináza K a pro dosažení silného signálu bylo třeba navýšit koncentraci DNA sondy z 20 ng/ml (Mostegl a kol., 2010) na 2000 ng/ml.

4.6.1 Příprava histologických řezů pro CISH – fixace, zalévání, krájení

Použité chemikálie

- pufrovaný formaldehyd, 7%
dH₂O 235,5 ml
formaldehyd 37% 17,5 ml
NaH₂PO₄ x 2H₂O 1,13 g
Na₂HPO₄ x 2H₂O 2,037 g
- Bouinova fixáž (Sigma)
- etanol, 70%
- JB-4 (Sigma) – infiltrační a polymerační roztok (viz kap. 4.2.2)
- LR White Medium Grade (SPI Supplies) infiltrační roztok
- polymerační roztok LR White - LR White Medium Grade 5 ml
- benzoyl peroxid 0,099 g

Fixace

Vzorky byly pro metodu CISH fixovány 16 – 24 hodin v 7% pufrovaném formaldehydu nebo Bouinově fixáži a po odstranění fixáže byly promyty 70% etanolem, ve kterém byly uchovávány až do zalití.

Zalévání do JB-4 média

Postup zalévání vzorků do JB-4 média pro CISH byl totožný jako u klasické histologie (viz kap. 4.2.2). Roupí byli na dně kapsle orientováni vodorovně, čímž při krájení vznikly podélné řezy.

Zalévání do LR-White média

LR White (SPI Supplies) je akrylátová pryskyřice používaná jak v klasické histologii, tak v transmisní elektronové mikroskopii a imunohistochemii. Polymerace média probíhá buďto za zvýšené teploty, nebo vystavením UV světlu. Výrobce nabízí 3 varianty tvrdosti média (Soft, Medium, Hard), z čehož pro účely této práce byl použit střední stupeň tvrdosti.

Nejprve byli roupi odvodněni dvojím promytím v 96% etanolu a poté infiltrováni LR White médiem. Infiltrace probíhala při pokojové teplotě a roztok LR White byl dvakrát po 60 minutách vyměněn. Roupi byli poté vodorovně orientováni na dno želatinových kapslí a zaliti polymeračním roztokem – roztok LR White s přídavkem benzoyl peroxidu (akcelerátor polymerace), který byl pomocí injekční stříkačky a jehly vpraven do uzavřené kapsle až do jejího úplného naplnění (přítomnost vzduchu by bránila následné polymeraci média). Polymerace probíhala 15 – 20 minut pod UV lampou. V této fázi mohla být kapsle odstraněna a bloček nakrájen na mikrotomu.

Krájení histologických řezů

Ze zpolymerovaných bločků byly na mikrotomu pomocí skleněných nožů nakrájeny řezy o tloušťce 2,5 μm . Řezy byly přeneseny do kapky destilované vody na povrchově upravená sklíčka Superfrost Plus (Thermo Scientific). Poté řezy zasychaly na plotýnce při teplotě 56 °C po dobu 16 – 24 hodin (Cao a Beckstead, 1989).

4.6.2 *In situ* hybridizace

Použité chemikálie

- pepsin (pepsin from porcine gastric mucosa; Sigma)
- proteináza K (proteinase K, recombinant, PCR grade; Roche)
- HCl, 0,01 M
- destilovaná voda
- formamid (AppliChem)
- dextran sulfát (Sigma), 50% w/v v dH₂O
- Denhardtův roztok 50x
 - Ficoll 400 (Sigma) 0,1 g
 - BSA (Sigma) 0,1 g
 - PVP (Sigma) 0,1 g

dH₂O 100 ml

- oligonukleotidová sonda o sekvenci 5' – TTG CGG TCG TAG TTC CCC CAG AGC CCA AGA ACT – 3' značená na 3' konci digoxigeninem (Sigma)
- herring sperm DNA (Sigma)
- protilátka proti digoxigeninu konjugovaná s alkalickou fosfatázou (Anti-digoxigenin-AP, Fab fragments; Roche)
- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát (BCIP; Sigma)
- nitrotetrazoliová modř (NBT; Sigma)

Pufry

sodium citrátový pufr (SSC) 20x

3 M NaCl

0,3 M C₆H₅Na₃O₇

- pH 7 (úprava pomocí koncentrované HCl)

pufr pro Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments („protilátkový pufr“)

0,1 M Tris

0,15 M NaCl

- pH 7,5 (úprava pomocí koncentrované HCl)

pufr pro BCIP/NBT

0,1 M Tris

0,1 M NaCl

5 mM MgCl₂

- pH 9,5 (úprava pomocí koncentrované HCl)

TE (Tris-EDTA) pufr

1 M Tris, pH 8 – 1 ml

0,5 M EDTA – 0,2 ml

dH₂O – do 100 ml

TBS

NaCl 2 g

KCl 0,05 g

Tris base 0,75 g

- pH 7,4 (úprava pomocí koncentrované HCl)

Postup

1) Proteolýza. Obkreslení oblastí s řezy hydrofobním fixem, pokrytí oblasti řezů o velikosti krycího sklíčka (22x22 mm) 200 μ l roztoku proteolytického enzymu:

a) pepsin o koncentraci 4 mg/ml v 0,01 M HCl,

b) proteináza K o koncentraci 50 μ g/ml v TBS.

Umístění sklíček do vlhké komůrky, inkubace 2 hodiny při 37 °C.

2) Opláchnutí sklíček dH₂O, oschnutí.

3) Inkubace s hybridizačním roztokem. Pokrytí oblasti řezů o velikosti krycího sklíčka (22x22 mm) 200 μ l roztoku. 100 μ l roztoku obsahuje: 50 μ l formamidu, 20 μ l SSC (20x), 10 μ l dextran sulfátu (50%), 12 μ l dH₂O, 2 μ l Denhardtova roztoku, 1 μ l DNA sondy o koncentraci 2000 ng/ml, 5 μ l rybí DNA. Umístění sklíček do vlhké komůrky, inkubace 15-18 hodin při 40 °C.

4) Promývání SSC pufrem: 2x koncentrovaný – 15 minut

1x koncentrovaný – 15 minut

0,1x koncentrovaný – 2x 15 minut

5) Inkubace s protilátkou proti digoxigeninu konjugovanou s alkalickou fosfatázou. Ihned po promytí (aniž by řezy zaschly) pokrytí oblasti řezů o velikosti krycího sklíčka (22x22 mm) 200 μ l roztoku 200x zředěné protilátky v protilátkovém pufru. Inkubace ve vlhké komůrce při pokojové teplotě 1 hodinu.

6) Promytí „protilátkovým pufrem“ – 15 minut.

7) Vizualizace signálu – inkubace s roztokem BCIP/NBT. Ihned po promytí (aniž by řezy zaschly) pokrytí oblasti řezů o velikosti krycího sklíčka (22x22 mm) 200 μ l roztoku. Roztok připravíme následovně:

1 ml pufru pro BCIP/NBT

3,3 μ l zásobního roztoku BCIP (koncentrace 50 mg/ml v dH₂O)

33 μ l zásobního roztoku NBT (koncentrace 10 mg/ml v dH₂O)

Inkubace 1 hodinu při pokojové teplotě ve vlhké komůrce chráněné před světlem.

8) Zastavení vývoje barvy opláchnutím v TE pufru.

9) Zaschnutí, zamontování Aquatex médiem, zalakování krycích sklíček.

4.7 Mikroskopické pozorování a zpracování preparátů

Preparáty zhotovené technikami klasické histologie, *in situ* hybridizace a barvením protargolem dle Bodiana byly pozorovány mikroskopem OLYMPUS BX51. Pomocí digitální kamery OLYMPUS DP71 byly zhotoveny snímky pozorovaných objektů, které byly dále přes program Quick PHOTO MICRO 2.3 uloženy do počítače ve formátu tif. Dodatečné úpravy snímků probíhaly v programu Photoshop CS5.

4.8 DNA analýza

4.8.1 Příprava vzorků

Nejprve byl sterilně odebrán vzorek tráveniny ze slepého střeva. Pozitivní roupi (roupi, v jejichž střevě byly pozorovány trichomonády) vybraní ze slepého a tlustého střeva byli umístěni do Petriho misky a propláchnuti dvakrát po 15 minutách v trisovém pufru pH 7,8 a jednou 15 minut v destilované vodě. Tímto postupem bylo zajištěno, že na vnějším povrchu roupů nebo v jejich okolí nezůstaly žádné trichomonády, které by zkreslovaly následnou analýzu. Poté bylo jako kontrola odebráno 200 µl destilované vody z Petriho misky s roupí. Nakonec byli sesbírání pozitivní roupi. Vzorek tráveniny, proplachu i roupů byl uchován v -20 °C k následné izolaci DNA.

4.8.2 Izolace DNA

Izolace DNA z tráveniny probíhala pomocí komerčně dostupného kitu QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) podle přiloženého protokolu „Protocol for Isolation of DNA from Stool for Pathogen Detection“. Izolace DNA z roupů a kontrol z proplachu probíhala pomocí kitu QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN), podle přiloženého protokolu „DNA Purification from Tissues“. K homogenizaci roupů byly používány umělohmotné tloučky do mikrozku mávek. Izolovaná DNA byla dlouhodobě skladována v -20 °C v elučním pufru.

4.8.3 Amplifikace DNA

Pro amplifikaci pomocí specifických primerů byl zvolen gen pro RNA malé ribosomální podjednotky – SSU rRNA. Pokud nedošlo k amplifikaci očekávaného fragmentu pomocí klasické PCR s použitím 16SF (Tachezy a kol., 2002) a 16SRR (Čepicka a kol., 2005) primerů specifických pro SSU rDNA skupiny Parabasalia, pak byla provedena nested PCR s dvojicí primárních univerzálních eukaryotických primerů Medlin A a Medlin B (Medlin a kol., 1988) a sekundárních primerů 16SF a 16SRR. Reakční směs byla namíchána z jednotlivých složek kitu PPP master mix (Top-Bio s.r.o.) – viz tab. 4 pro klasickou PCR a tab. 5 pro nested PCR. Sekvence primerů jsou uvedené v tab. 6. Pro primery 16SF a 16SRR byla oproti základnímu protokolu uvedenému výrobcem optimalizována koncentrace $MgCl_2$ z 5 μl na 4 μl . Za této koncentrace bylo dosaženo nejlepších výsledků. Reakce probíhala v cycleru C1000TM Thermal Cycler (BIO-RAD) za podmínek shrnutých v tab. 7.

Tab. 4: Složení reakční směsi pro klasickou PCR.

Chemikálie	Množství
PPP master mix	25 μl
$MgCl_2$	4 μl
Templátová DNA	3 μl
Primer forward – 16SF	12,5 pmol
Primer reverse – 16SRR	12,5 pmol
PCR H_2O	do 50 μl

Tab. 5: Složení reakční směsi pro nested PCR.

	Primární PCR (primery MA a MB)	Sekundární PCR (primery 16SF a 16SRR)
PPP master mix	25 μl	25 μl
$MgCl_2$	5 μl	4 μl
Templátová DNA	3 μl	2 μl
Primer forward	10 pmol	12,5 pmol
Primer reverse	10 pmol	12,5 pmol
PCR H_2O	do 50 μl	do 50 μl

Tab. 6: Sekvence primerů pro amplifikaci SSU DNA.

Primer	Sekvence 5' - 3'
16SF	TACTTGGTTGATCCTGCC
16SRR	TCACCTACCGTTACCTTG
Medlin A (MA)	AYCTGGTTGATYYTGCCAG
Medlin B (MB)	TGATCCATCTGCAGGTTACCT

Tab. 7: Nastavení teplotního cyklu pro PCR.

Část cyklu		Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace		94 °C	5 min	1
Denaturace		94 °C	30 s	30-35 *
Nasednutí primerů	16SF a 16SRR	58 °C	30 s	
	MA a MB	50 °C		
Polymerace		72 °C	2 min	
Závěrečná polymerace		72 °C	15 min	1

* v několika případech byl počet cyklů zvýšen až na 40 a 45

4.8.4 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza byla provedena na horizontálním 1% agarózovém gelu v elektroforetické vaně (Cleaver – Scientific Ltd nebo Owl Easycast™ B1 – Thermo Scientific) se zdrojem (Hoefer PS 300 – B) při napětí 120 V. Do jamek v gelu byla napipetována směs 5-10 µl PCR produktu a 0,5 µl SYBR® Green I (Invitrogen). Jako marker byl použit GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder, opět s 0,5 µl SYBR® Green I (Invitrogen). Gel byl vyfocen pod UV lampou.

4.8.5 Purifikace PCR produktu

Jestliže byl na gelu patrný pouze jeden fragment, byl PCR produkt purifikován přímo z reakce pomocí komerčně dodávaného kitu MinElute® PCR Purification Kit (Qiagen). V případě, že na gelu bylo patrně více fragmentů, byla provedena elektroforéza s větším množstvím PCR produktu, požadované fragmenty byly z gelu vyříznuty sterilním skalpelem a přečištěny pomocí kitu MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen). V obou případech byla purifikovaná DNA eluována do 10 µl sterilní H₂O. Následně byla koncentrace purifikované DNA změřena na spektrofotometru ND-1000 (NanoDrop®) a vzorek byl uchován v -20 °C. Produkty získané přímo z PCR reakce byly následně osekvenovány. U produktů získaných purifikací z gelu byla naměřená koncentrace DNA příliš nízká, a proto bylo zapotřebí fragmenty zaklonovat do plasmidu (viz kap. 4.8.6) a až poté sekvenovat.

4.8.6 Klonování

Pro klonování přečištěných fragmentů z gelu byl použit kit pro A/T klonování TA Cloning® Kit (Invitrogen). Selektce buněk s plasmidem obsahujícím inzert probíhá díky rezistenci takových buněk ke kanamycinu a díky modrobílé selekci založené na nepřítomnosti/přítomnosti inzertu v plasmidu buněk. Postup odpovídal přiloženému

protokolu. Nejprve byl čerstvý purifikovaný PCR produkt vložen do pCR[®] 2.1 vektoru za použití T4 DNA ligázy při teplotě 14° C přes noc. Množství vkládaného inzertu v ligační směsi bylo cca 20 ng. Následně byly plasmidy vneseny do kompetentních buněk TOP10 *Escherichia coli* a 100 µl transformovaných buněk bylo vyseto na plotny s LB médiem obsahující kanamycin (viz kap. 4.8.6.1). Plotny byly inkubovány přes noc při 37°C. Další den byly některé z narostlých kolonií přeneseny na novou plotnu s agarem, kanamycinem a rozetřenými 30µl X-Gal (50 mg/ml), aby zde rostly opět přes noc při 37° C. Poté byly vybrány bílé kolonie a byla provedena kontrolní PCR a elektroforéza pro ověření přítomnosti inzertu v plasmidu (viz kap. 4.8.6.2). Vytipované kolonie byly poté z ploten přeneseny do 2 ml tekutého LB média s kanamycinem (bez agaru) a inkubovány přes noc při 37° C v třepacím inkubátoru Max^Q 4000 při 200 ot/min. Následovala izolace plasmidové DNA (viz kap. 4.8.6.3) a sekvenace (viz kap 4.8.7).

4.8.6.1 Příprava LB média

Složení:

- LB Broth (Sigma) 10 g
- destilovaná voda 500 ml
- agar (Sigma) 5 g (pro přípravu tekutého LB média byl agar vynechán)

Namíchané médium s agarem bylo vyklákováno a po zchladnutí na cca 50° C bylo do roztoku přimícháno antibiotikum kanamycin (50 µg/ml). Médium bylo rozlito do Petriho misek a ponecháno ztuhnout. LB médium bez agaru bylo vyklákováno a po úplném zchladnutí byl přidán kanamycin v téže koncentraci. Plotny i tekuté médium byly do použití skladovány při 4° C.

4.8.6.2 Kontrola přítomnosti inzertu v plasmidu pomocí PCR a elektroforézy

Pomocí sterilní špičky byla odebrána část bílých kolonií a resuspendována v 8,2 µl PCR H₂O ve sterilních mikrozkušavkách. Následovala degradace buněk bakterií pomocí střídání teplot v navoleném cyklu v termocykléru (viz tab. 8). Do zkumavky k suspenzi degradovaných buněk byla napipetována reakční směs pro PCR (viz tab. 9) a samotná reakce probíhala s teplotním nastavením dle tab. 10.

Tab. 8: Nastavení termocykléru pro degradaci buněk bakterií.

Krok číslo	Teplota (°C)	Čas (min:s)	Počet cyklů
1	96	5	1
2	50	1:50	
3	96	1:50	
4	45	1:00	
5	96	1:00	
6	40	1:00	
7	4	2:00	

Tab. 9: Složení reakční směsi pro kontrolní PCR.

Chemikálie	Množství
PPP master mix	13,5 µl
MgCl ₂	2,5 µl
Primer forward – M13F (10 µl)	0,5 µl
Primer reverse – M13R (10 µl)	0,5 µl

Tab. 10: Nastavení teplotního cyklu pro kontrolní PCR.

Část cyklu	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94 °C	2 min	1
Denaturace	94 °C	1 min	30
Nasednutí primerů	55 °C	1 min	
Polymerace	72 °C	1 min	
Závěrečná polymerace	72 °C	10 min	1

4.8.6.3 Izolace plasmidové DNA

Nejprve byly narostlé buňky centrifugovány při 2000 rpm po dobu 5 minut a supernatant byl odlit. Izolace plasmidů poté probíhala pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Plasmidová DNA byla eluována do 15 µl sterilní H₂O a koncentrace vyizolované DNA byla měřena na spektrofotometru (NanoDrop® ND-1000, ThermoFisher Scientific). Vzorek byl skladován v -20 °C.

4.8.7 Sekvenační reakce

Vzorky pro sekvenační reakci byly namíchány tak, aby obsahovaly 10 ng templátové DNA na 100 bp délky předpokládané sekvence, 3,2 pmol požadovaného primeru (viz tab. 11) a sterilní vodu do celkového objemu 14 µl. Poté byly mikrozkušavky se směsí předány do Laboratoře sekvenace DNA na PřF UK, kde byla provedena vlastní reakce.

Tab. 11: Primery použité pro sekvenaci

Primer	Sekvence 5' - 3'
M13F	CTGGCCGTCGTTTAC
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC
16SF (Tachezy a kol., 2002)	TACTTGGTTGATCCTGCC
16SRR (Čepicka a kol., 2005)	TCACCTACCGTTACCTTG
514F	GTGCCAGCMGCCGCGG
665R	ATACWCTAAGCGTCCTG
1055F	GGTGGTGCATGGCCG
1055R	CGGCCATGCACCACC

Primery M13 jsou součástí kitu pro A/T klonování a nasedají na plazmid poblíž inzertu. Primery 1514F, 665R, 1055F, 1055R byly použity pro sekvenaci vnitřních oblastí regionu.

4.8.8 Vyhodnocení sekvencí a fylogenetická analýza

Sekvence získané sekvenací s jednotlivými primery byly složeny do „kontigů“ v programu SeqMan (z programového balíku DNASTAR), chyby při čtení byly opraveny a z konečných sekvencí byly odstraněny sekvence primerů.

4.8.9 Tvorba a úprava "alignmentu"

Taxonomická příslušnost zkoumaných druhů trichomonád byla nejprve odhadnuta pomocí metody blast na databázi NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Byl vytvořen „data set“ obsahující kromě 12 nově určených sekvencí také 10 SSU rDNA sekvencí rodů *Tritrichomonas*, *Simplicimonas* a dvou symbiontů z termitů termitů blízké příbuzných rodu *Simplicimonas*. Sekvence patřící druhu *Pentatrichomonas hominis* nebyla v analýze zahrnuta. Sekvence byly „zalignovány“ metodou MAFFT (Katoh a kol., 2002) pomocí internetového serveru <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>. Parametry nastavení nebyly měněny. „Alignment“ byl poté upraven v programu BioEdit 7.1.3. Byly odstraněny ty variabilní oblasti, u kterých nebylo jisté, že byly správně „zalignovány“. Začátek a konec „alignmentu“ byl ořezán tak, aby všechny sekvence začínaly a končily na stejné pozici. U neúplných sekvencí byly chybějící nukleotidy nahrazeny neurčitými bázemi (n). Výsledná délka „alignmentu“ činila 1484 bp.

4.8.10 Tvorba fylogenetického stromu

Fylogenetický strom byl vytvořen metodou maximum likelihood v programu Phym1 (Guindon a Gascuel, 2003) s použitím modelu GTR + Γ + I. Pro „swapping“ byl použit algoritmus SPR. Pro odhad statistické podpory získané topologie byla v programu Phym1 provedena bootstrapová analýza s 1000 pseudoreplikáty. Grafické úpravy stromu probíhaly v programu CorelDRAW X6.

5 VÝSLEDKY

5.1 Data získaná během pitev

Během pitev byla odečítána intenzita infekce myši trichomonádami, počet a druh roupů ve střevě myši a intenzita výskytu trichomonád v roupech. Celkem bylo vyšetřeno 54 myší, z toho v jednom případě myš nehostila ani roup, ani trichomonády a v jednom případě byly trichomonády přítomny, ale roupů nikoliv. Ve zbylých 52 případech byly trichomonády v určitém množství přítomny vždy. U těchto případů byly zaznamenány počty přítomných červů (viz tab. 12). V 18 případech myši hostily pouze roup druhu *Aspiculuris tetraptera* (v počtu 4-120 jedinců na hostitele) a v 15 případech pouze roup druhu *Syphacia obvelata* (v počtu 3-50 jedinců na hostitele). V 19 případech byla zaznamenána koinfekce oběma druhy roupů. V případech s koinfekcí oběma druhy byli roup *A. tetraptera* přítomni v počtu od 3 do 70 jedinců. Počet jedinců *S. obvelata* při koinfekcích se pohyboval od 1 do 70.

Tab. 12. Počty roupů *A. tetraptera* a *S. obvelata* nalezených ve slepém a tlustém střevě myší.

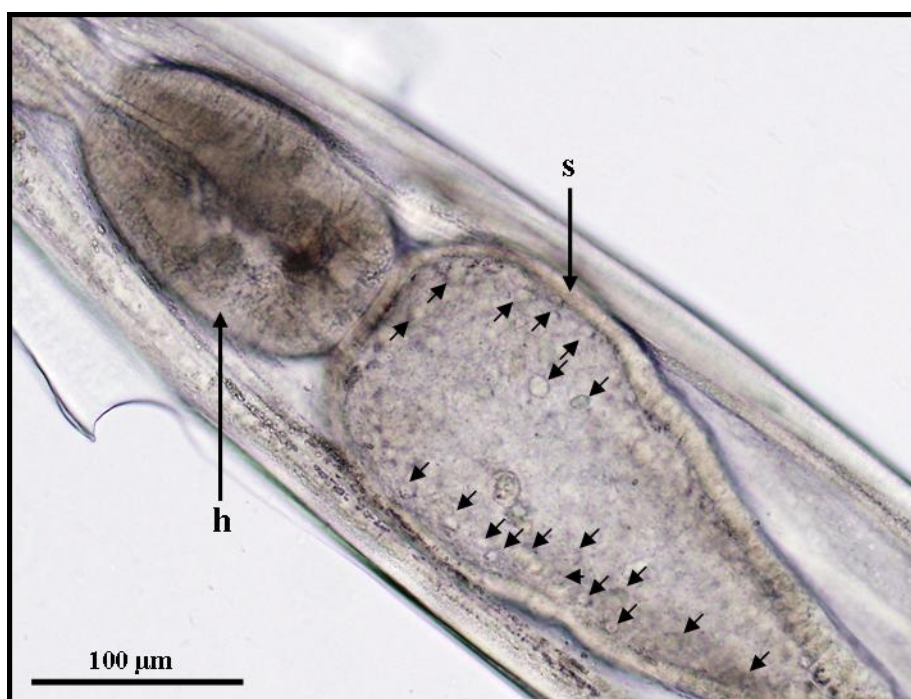
Počet roupů na hostitele	Jednoduchá infekce		Koinfekce	
	<i>Aspiculuris tetraptera</i>	<i>Syphacia obvelata</i>	<i>Aspiculuris tetraptera</i>	<i>Syphacia obvelata</i>
1-10	5	6	10	10
11-20	2	7	2	4
21-30	-	1	3	3
31-40	4	-	1	-
41-50	-	1	1	1
51-60	4	-	1	-
61-70	1	-	1	1
71-80	-	-	-	-
81-90	-	-	-	-
91-100	-	-	-	-
101-110	-	-	-	-
111-120	2	-	-	-
Celkový počet případů	18	15	19	

Tabulka znázorňuje počty případů v jednotlivých kategoriích (definovaných počtem nalezených roupů na hostitele) pro jednotlivé druhy roupů při jednoduché infekci a při koinfekci oběma druhy roupů.

Jak je patrné z tabulky č. 12, při koinfekci oběma druhy roupů byl zaznamenáván nižší počet roupů *A. tetraptera* na hostitele oproti jednoduché infekci pouze druhem *A. tetraptera*. Do kategorií od 51 do 120 nalezených jedinců roupů na hostitele bylo zařazeno při jednoduché infekci 7 případů, oproti 2 případům s koinfekcí oběma druhy

roupů. Naproti tomu do kategorií od 1 do 50 roupů na hostitele bylo zařazeno 11 případů s jednoduchou infekcí *A. tetraptera* oproti 17 případům s koinfekcí oběma druhy roupů. U roupů *S. obvelata* byl počet roupů při koinfekci a jednoduché infekci podobný.





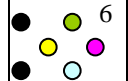















Ve střevě roupů obou druhů byl v různé míře pozorován výskyt trichomonád (viz obr. 1). V některých případech se jednalo o ojedinělé buňky prvoků, jindy bylo střevo rouna plné trichomonád. Prvoci se vyskytovali po celé délce střeva, a nejvíce jich bylo přítomno v rozšíření střeva za hltanovým bulbem a distálním směrem se jejich počet zmenšoval (při střední a slabé intenzitě výskytu). Po celé délce střeva prvoci vykazovali motilitu a přelézali se napříč střevem spolu s tráveninou s peristaltickými vlnami probíhajícími střevem rouna. Prvoci byli pozorováni u dospělých samic a samců, nikoliv však u larev.



Obr. 1: Trichomonády ve střevě rouna *Aspicularis tetraptera*. h hltan, s střevo, šipky bez popisek označují buňky trichomonád

Intenzitu infekce myši a intenzitu výskytu trichomonád v roupech v jednotlivých případech (u jednotlivých myší) dokumentuje tabulka zobrazující rozložení případů podle intenzity nákazy/výskytu trichomonád pro jednotlivé druhy roupů (viz tab. 13).

Tab 13: Rozložení případů podle intenzity infekce myši trichomonádami a intenzity výskytu trichomonád v roupech jednotlivých druhů.

<i>Aspiculuris tetraptera</i>					<i>Syphacia obvelata</i>				
Intenzita výskytu trichomonád v roupech/ intenzita infekce myši trichomonádami	Žádná	Slabá	Střední	Silná	Intenzita výskytu trichomonád v roupech/ intenzita infekce myši trichomonádami	Žádná	Slabá	Střední	Silná
Žádná	 3	0	0	0	Žádná	 4	0	0	0
Slabá	 8	 1	0	0	Slabá	 6	 1	0	0
Střední	 4	 3	 6	 1	Střední	 5	 3	0	 1
Silná	 2	 1	 3	 5	Silná	 7	 1	 6	0

Tabulka znázorňuje rozložení případů (myší) pro jednotlivé druhy roupů podle intenzity infekce myši trichomonádami (řádky) a intenzity výskytu trichomonád v roupech (sloupce). Tečky znázorňují jednotlivé případy. Tečky černé barvy odpovídají případům s infekcí jedním druhem roupa a barevné tečky případům s infekcí oběma druhy roupů. Tečka shodné barvy v obou částech tabulky odpovídá identickému případu. Čísla v pravém horním rohu jsou součtem jednotlivých případů v určité kategorii.

Z umístění případů v tabulce je patrné, že frekvence výskytu trichomonád v roupech se u myší hostících roupy *A. tetraptera* a *S. obvelata* do jisté míry liší. U myší hostících roupy *A. tetraptera* (oproti myším hostícím *S. obvelata*) byl častěji zaznamenán stav, kdy při střední nebo silné intenzitě infekce myši trichomonádami byla intenzita výskytu trichomonád v roupech též střední nebo silná. Naproti tomu u myší se střední nebo silnou intenzitou infekce trichomonádami, které hostily roupy *S. obvelata*, byli roupi častěji na trichomonády negativní nebo byla zaznamenána slabá intenzita výskytu trichomonád v roupech.

Pozitivita roupů (výskyt trichomonád v roupech ve slabé, střední a silné intenzitě) byla vyjádřena procentuálně (viz tab. 14): pozitivní roudy jakéhokoliv druhu hostilo 54% vyšetřených myší (28 z 52). Pokud myš hostila pouze roudy *A. tetraptera*, ti byli pozitivní v 56% případů (10 z 18) a v případě jednoduché infekce roudy *S. obvelata* byla pozitivita 33% (5 z 15). V případech koinfekcí oběma druhy byli roudi *A. tetraptera* pozitivní v 53% případů (10 z 19) a roudi *S. obvelata* v 37% případů (7 z 19). Celkově (u jednoduchých infekcí i koinfekcí) byli pozitivní roudi *A. tetraptera* nalezeni v 54% případů (20 z 37) a roudi *S. obvelata* v 35% případů (12 z 34).

Tab 14: Procentuální vyjádření počtu případů s „pozitivními“ roudy (roudy s trichomonádami ve střevě).

Druh rouda	Charakter infekce	Počet případů	Počet případů s pozitivními roudy	% případů s pozitivními roudy
<i>A. tetraptera</i>	Jednoduchá	18	10	55,55
	Koinfekce s <i>S. obvelata</i>	19	10	52,63
	Celkem	37	20	54,05
<i>S. obvelata</i>	Jednoduchá	15	5	33,33
	Koinfekce s <i>A. tetraptera</i>	19	7	36,84
	Celkem	34	12	35,29
celkem	Alespoň jedním druhem rouda	52	28*	53,84

*Počet případů, kdy byli nalezeni pozitivní roudi alespoň jednoho druhu.

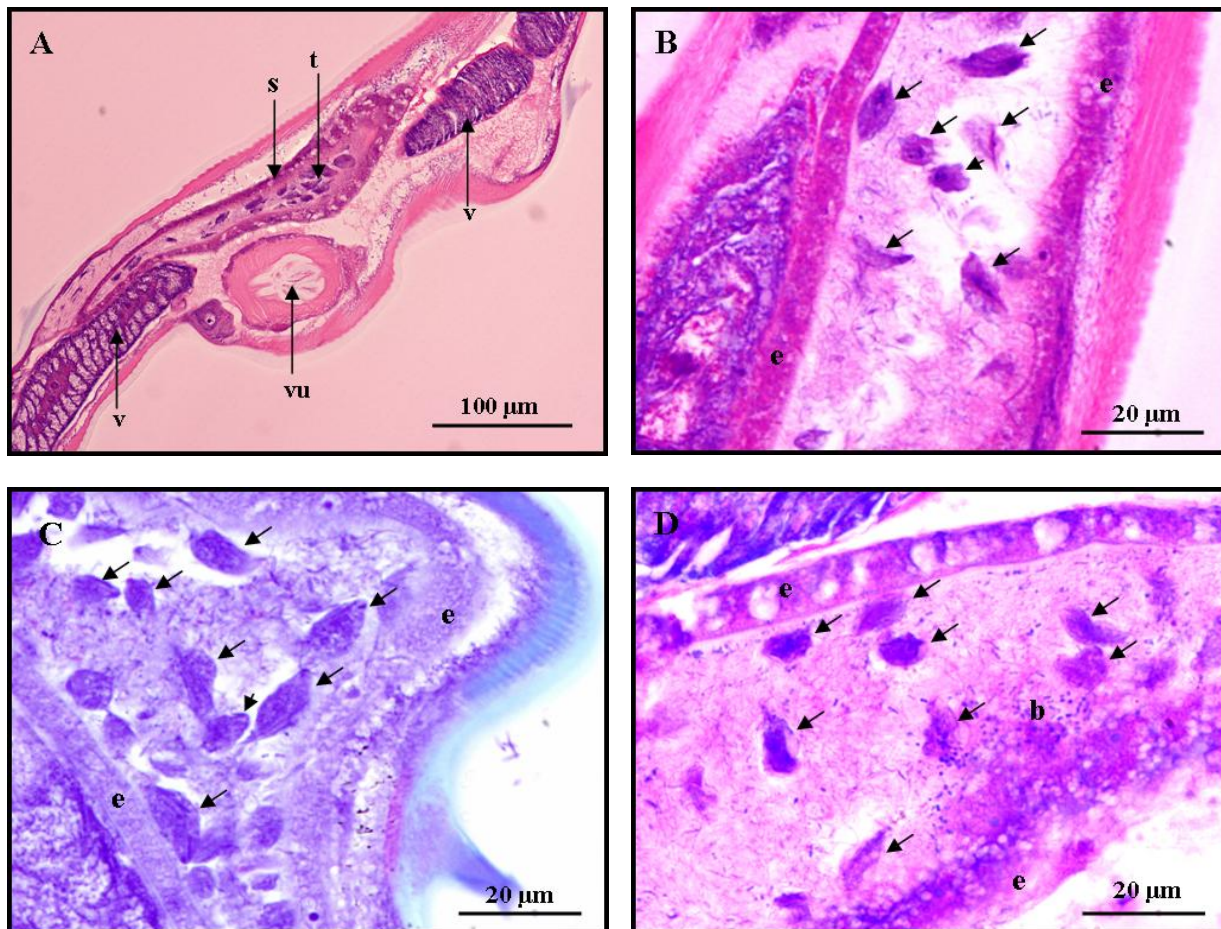
Ve třech případech byly ve střevě myši kromě prvoků a roupů nalezeny také vajíčka a dospělci tasemnic *Hymenolepis nana*. Nebyla zaznamenána korelace výskytu tasemnic s intenzitou infekce roudy nebo trichomonádami.

5.2 Klasická histologie a další techniky – dokumentace

přítomnosti trichomonád v tělech rousů

Pomocí klasické histologie byla zdokumentována přítomnost trichomonád v tělech myších rousů na řezech červů pozitivních na trichomonády. Dále byla technika využita k vyhledávání případné mimostřevní lokalizace prvoků v roupech a určení jejich druhu na základě morfologie – techniky bylo využito k podpoření výsledků fylogenetické analýzy díky determinaci druhu trichomonád přítomných v roupech pomocí měření buněk prvoků (viz kap. 5.5). Za účelem optimálního znázornění morfologických znaků prvoků byly vyzkoušeny další techniky aplikované na histologické řezy – stříbření pomocí AgNO_3 a barvení protargolem podle Bodian. Ve střevě rousů byla kromě trichomonád zaznamenána i přítomnost bakterií.

Z použitých barvení se jako nejvhodnější ukázalo být barvení Giemsou (viz obr. 2C), které znázornilo nejvíce buněčných struktur. Axostyl byl jako podélný pruh patrný po celé délce buňky a poměrně dobře byl znázorněn i tvar jeho zakončení. Podélně pod povrchem buňky se nacházela tmavší linie kosty, nad kterou byla v některých případech patrná zvlněná undulující membrána. O něco méně názorného obarvení buněčných struktur trichomonád bylo dosaženo barvením hematoxylinem-eosinem (viz obr. 2A,B). Bylo dosaženo znázornění struktury axostylu v podobě tmavšího pruhu se světlejším středem vedoucím podélně buňkou a v některých případech bylo možné pozorovat i tvar jeho zakončení na konci buňky. Dále byla obarvena jádra prvoků a v některých případech i kosty. Bičíky ani undulující membrána nebyly pozorovatelné. Nejméně přínosným se ukázalo být barvení methylenovou modří-bazickým fuchsinem (viz obr. 2D). V podélném směru buněčného těla byl v některých případech patrný světlejší pruh pravděpodobně odpovídající axostylu. Ostatní buněčné struktury však nebyly dobře rozeznatelné.



Obr. 2: Histologické řezy myšími roupy *Syphacia obvelata* s trichomonádami ve střevě.

A: Hematoxylin-eosin, celkový pohled na řez roupem, ve střevě jsou patrné buňky prvoků. **B:** Hematoxylin-eosin, detailní pohled. **C:** Giemsa. **D:** Methylenová modř-bazický fuchsin. **b** bakterie, **e** epitel střeva, **s** střevo, **t** trichomonády ve střevě, **v** vaječník, **vu** vulva, šipky bez popisek označují buňky trichomonád.

5.2.1 Hledání trichomonád mimo střevo roupů

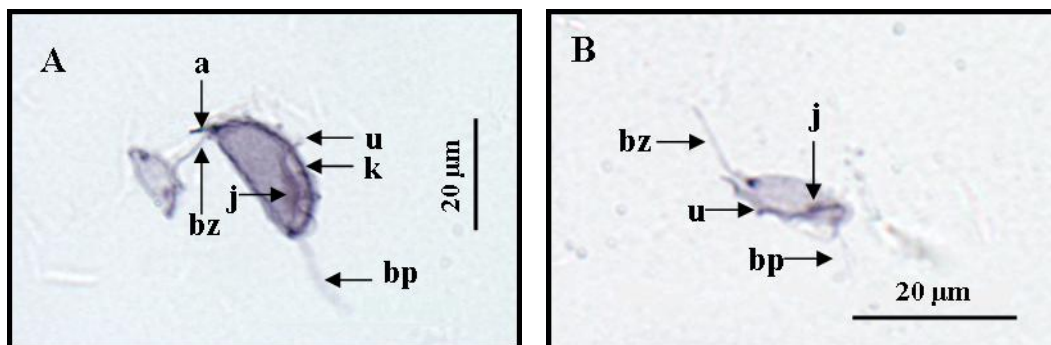
Barvení Giemsou bylo využito i pro hledání trichomonád v tělech roupů v jiné lokalizaci než ve střevě. Hodnoceny byly příčné řezy z celkem 10 samic roupů pozitivních na trichomonády (8 jedinců *Aspiculuris tetraptera* a 2 jedinců *Syphacia obvelata*). Buňky trichomonád byly pozorovány na všech řezech pouze v lumenu střeva a nikoliv v dalších tkáních.

5.2.2 Stříbření AgNO₃

Pokus o obarvení histologických řezů roupu pozitivních na trichomonády technikou stříbření skončil neúspěchem. Po vystavení řezů působení UV záření nedošlo k vývoji barevné reakce (pravděpodobně kvůli nevhodnosti JB-4 zalévacího média pro tento typ zpracování) a technika nebyla dále používána.

5.2.3 Barvení protargolem podle Bodiana

Barvení protargolem bylo primárně použito na histologické řezy pozitivních roupu a mělo umožnit znázornění morfologických struktur trichomonád přítomných ve střevě roupu. Zároveň bylo barvení aplikováno na vlhké roztěry obsahu slepého střeva myši, ze kterých byli získáni pozitivní roupi. Barvení roztěrů ze slepého střeva dvou myši přineslo uspokojivý výsledek a umožnilo determinaci druhů zachycených trichomonád do druhu na základě morfologie. Oba druhy se od sebe lišily hlavně ve velikosti a vykazovaly znaky typické pro rod *Tritrichomonas*, tedy 3 volné přední bičíky, bohatě zvlněnou undulující membránu (u *Tritrichomonas minuta* je zvlnění undulující membrány méně intenzivní než u *Tritrichomonas muris*), na jejímž konci pokračuje distální část zadního bičku, a silnou kostu podkládající undulující membránu (viz obr. 3). Nalezené trichomonády byly identifikovány jako *T. muris* a *T. minuta*. V jednom případě byly na roztěru zachyceny pouze prvoci druhu *T. muris*, v druhém případě šlo o smíšenou infekci oběma druhy trichomonád. Pokus o obarvení histologických řezů různých tloušťek (viz kap. 4.4) na krycím skle byl neúspěšný, protože řezy zaschlé na skle nevydržely dlouhou přípravu a barvení. Barvení protargolem se tedy ukázalo být nevhodné pro barvení histologických řezů zalitých v JB-4 médiu.

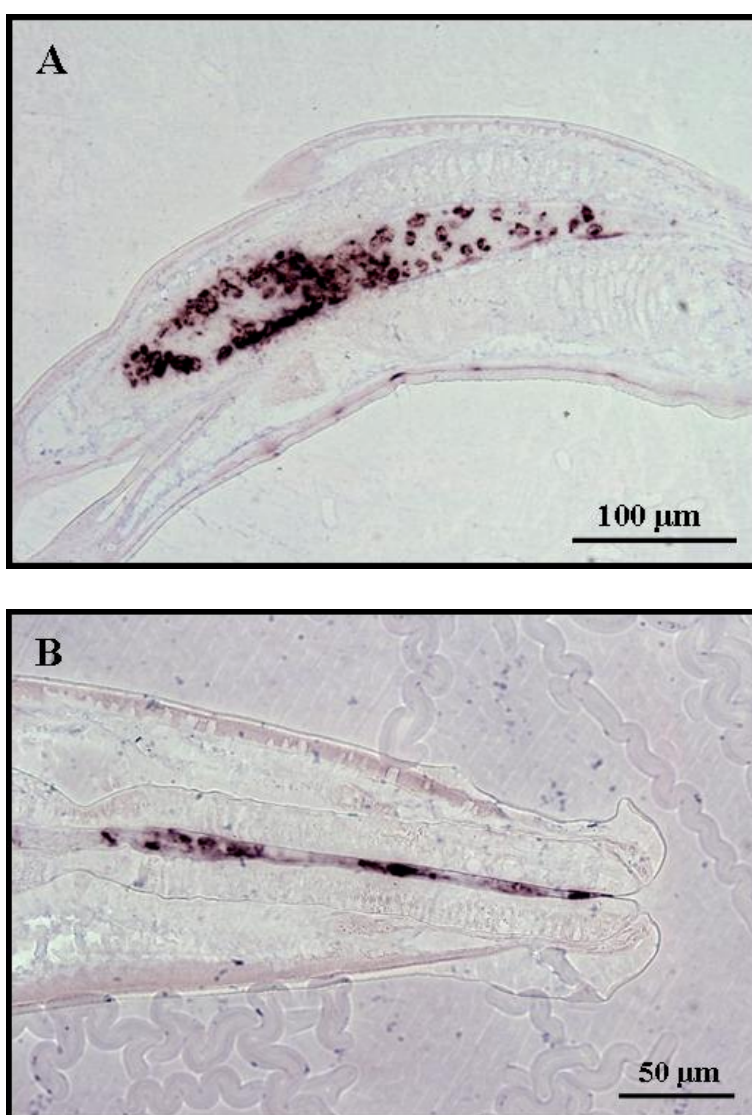


Obr. 3: *Tritrichomonas muris* a *Tritrichomonas minuta* na roztěru ze slepého střeva myši barveném protargolem.

A: *T. minuta* (vlevo) a *T. muris* (vpravo), porovnání velikosti. B: *T. minuta*. a zakončení axostylu, bp přední bičíky, bz zadní bičků, j jádro, k kost, u undulující membrána.

5.3 Lokalizace trichomonád v roupech pomocí *in situ* hybridizace

Technika *in situ* hybridizace byla v práci použita k vyhledávání trichomonád v tělech rousů. Po optimalizaci postupu a dosažení jasného signálu umožňujícího jednoznačné odečítání přítomnosti prvoka na řezu bylo zpracováno 22 samic rousů, z toho 17 druhu *Aspiculuris tetraptera* a 5 druhu *Syphacia obvelata*. Ve všech případech se trichomonády vyskytovaly pouze v lumenu střeva (viz obr. 4A) a v některých případech v ústním ústrojí (viz obr. 4B). Nikdy nebyla zaznamenána přítomnost trichomonád v jiné lokalizaci.



Obr. 4: *In situ* hybridizace, detekce signálu (odpovídající buňkám trichomonád) na řezích pozitivních rousů *Aspiculuris tetraptera*.

A: Trichomonády v lumenu střeva rousa. **B:** Trichomonády v ústním ústrojí rousa.

5.4 Popis trichomonád ve střevě roupů pomocí TEM

Transmisní elektronové mikroskopie bylo v práci využito ke studiu trichomonád ve střevě roupů. Pomocí TEM bylo možné sledovat, zda dochází k interakci prvoka s epitelem střeva, zda se prvoci ve střevě roupa dělí, endocytují, v jakém se nachází morfologickém stavu atd. Dále bylo metody využito k určení druhu přítomných trichomonád podle ultrastrukturálních znaků, a také k hledání prvoků v případné mimostřevní lokalizaci.

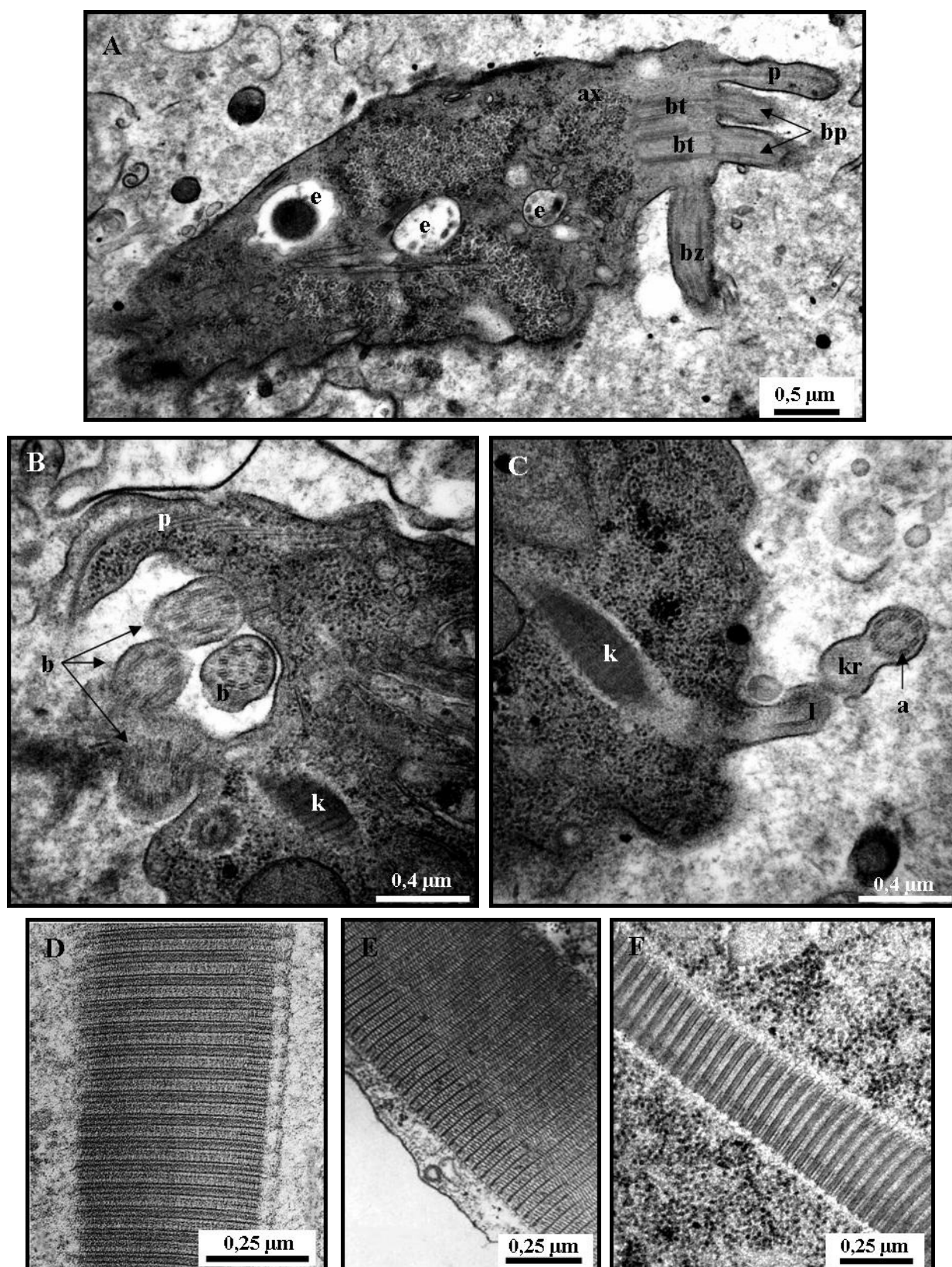
5.4.1 Určení druhu trichomonád pomocí TEM

Prvním krokem k určení druhové příslušnosti trichomonád přítomných ve střevech roupů bylo zařazení prvoků do rodu. U nalezených prvoků byl opakovaně nalézán mastigont se čtyřmi bičíky (viz obr 5B) – třemi předními a jedním zadním. Bazální tělísko zadního bičíku bylo kolmé na bazální tělíska ostatních bičíků (viz obr. 5A). Tento znak zařadil přítomné trichomonády do rodu *Tritrichomonas* a vyloučil příslušnost k jinému rodu trichomonád vyskytujících se u myši domácí, a tudíž s určitou pravděpodobností se vyskytujících ve střevě roupů parazitujících tamtéž.

Dalším znakem umožňujícím rozlišení rodu *Tritrichomonas* od jiných rodů trichomonád je struktura undulující membrány. U nalezených prvoků bylo patrné, že struktura undulující membrány odpovídá typu „rail-type“, který je typický pro rod *Tritrichomonas*. Bičík je u tohoto typu undulující membrány přisedlý apikálně k lamelovitému výběžku cytoplazmatické membrány formujícímu undulující membránu (viz obr. 5C).

Žíhání kosty prvoků ve střevě roupů na příčném řezu bylo určeno jako typ A (viz obr. 5D,E,F), který je charakteristický pro rod *Tritrichomonas*. Axostyl prvoků byl trubicovitého tvaru, což značí příslušnost do téhož rodu (viz obr. 6E).

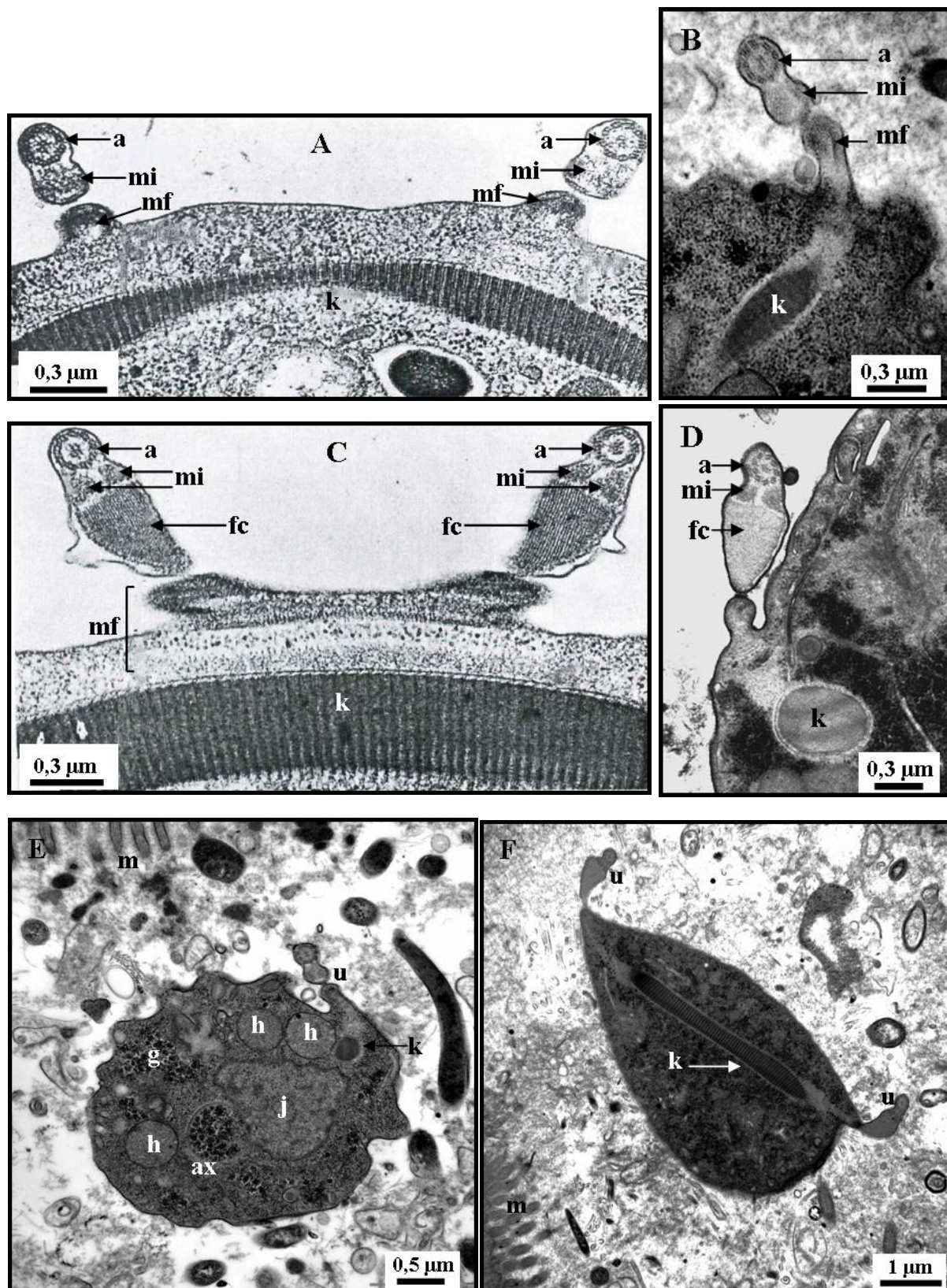
Podle uvedených znaků jsme dospěli k jednoznačnému závěru, že prvoci přítomní ve střevě roupů patří do rodu *Tritrichomonas*.



Obr. 5: Určení rodu trichomonád ve střevě rouspů pomocí TEM. A: Prvek rodu *Trichomonas* ve střevě rousp. B: Mastigont prvka rodu *Trichomonas* ze střeva rousp. C: Uduklující membrána prvka rodu *Trichomonas* ze střeva rousp. D: Kosta typu A, *T. foetus* (Tachezy a kol., 2002). E: Kosta typu B, *Trichomonas gigantea* (Amos a kol., 1979). F: Kosta prvka rodu *Trichomonas* ze střeva rousp. a axonema bičku, ax mikrotubuly axostylu, b biček, bp přední biček, bt bazální tělísko bičku, bz zadní biček, e endocytické váčky, k kosta, kr krystalinní struktura přilehlá k axonemě bičku, l lamelovitý výběžek cytoplasmatické membrány, p pelta.

5.4.1.1 Rozlišení druhů *Tritrichomonas muris/minuta*

Rozlišení myších prvoků rodu *Tritrichomonas* do druhu na TEM je možné podle velikosti buňky (viz kap. 2.3.2), nicméně my jsme druhy rozlišili především podle ultrastrukturního znaku patrnému na příčném řezu undulující membránou – přítomnosti/nepřítomnosti krystalinní struktury, která provází axonemu bičíku tvořící undulující membránu. Zatímco krystalinní struktura v undulující membráně *Tritrichomonas minuta* chybí a rekurentní bičík provází pouze svazky mikrofilament (viz obr. 6A), ta samá struktura je u *Tritrichomonas muris* dobře vyvinuta a má trojúhelníkovitý tvar špičkou přisedající k lamelle undulující membrány. Délka této struktury je přibližně jako dvě axonemy bičíku, přičemž je tato struktura na řezu asociovaná se dvěma svazky mikrofilament v oblasti u axonemy bičíku (viz obr. 6C). Ve střevě rousů jsme zaznamenali přítomnost obou druhů prvoků rodu *Tritrichomonas* – tedy *T. muris* i *T. minuta* (viz obr. 6B,D). Na obrázcích 6E a 6F je zachycen komplexní pohled na trofozoity trichomonád druhu *T. muris* a *T. minuta* v lumenu střeva rousů *S. obvelata*.



Obr. 6: Rozlišení prvoků *T. muris/minuta*. A: Ultrastruktura undulující membrány *T. minuta* (upraveno podle Brugerolle, 1981). B: Ultrastruktura undulující membrány *T. minuta* ze střeva roupa *S. obvelata*. C: Ultrastruktura undulující membrány *T. muris* (upraveno podle Brugerolle, 1981). D: Ultrastruktura undulující membrány *T. muris* ze střeva roupa *Aspiculuris tetraptera*. E: Trofozoit *T. minuta* v lumenu střeva roupa *S. obvelata*. F: Trofozoit *T. muris* v lumenu střeva roupa *S. obvelata*. a axonema zadního bičíku, ax axostyl, fc krystalinní struktura, g glykogenová granula, h hydrogenosomy, j jádro, k kosta, m mikrovili střevního epitelu roupa, mf mikrofibrily asociované s kostou, mi mikrofilamenta asociovaná s axonemou zadního bičíku.

5.4.2 Nalezené druhy trichomonád

Celkově byli na TEM zpracováni pozitivní roupi z 9 myší (viz tab. 15). Čtyři myši hostily roupy druhu *Aspiculuris tetraptera*, 4 roupy *Syphacia obvelata* a 1 myš oba druhy roupů. Pro zpracování na TEM byli vždy odebráni 1-2 pozitivní jedinci od jednoho druhu roupa. Bylo prokázáno, že roupi *A. tetraptera* ze 4 myší měli ve svém střevě prvoka druhu *Tritrichomonas muris*. Roupi *S. obvelata* z jedné myši hostili ve střevě také prvoka *T. muris*, roupi *S. obvelata* z další myši hostili jak prvoka *T. muris*, tak i *Tritrichomonas minuta*. V roupech *S. obvelata* ze zbývajících 2 myší nebyli prvoci nalezeni. Ve střevě roupů z myší s koinfekcí oběma druhy roupů byli v obou druzích roupů nalezeni prvoci stejného druhu, *T. muris*.

Tab. 15: Určení druhů trichomonád přítomných v roupech pomocí TEM a tvorba pseudocyst.

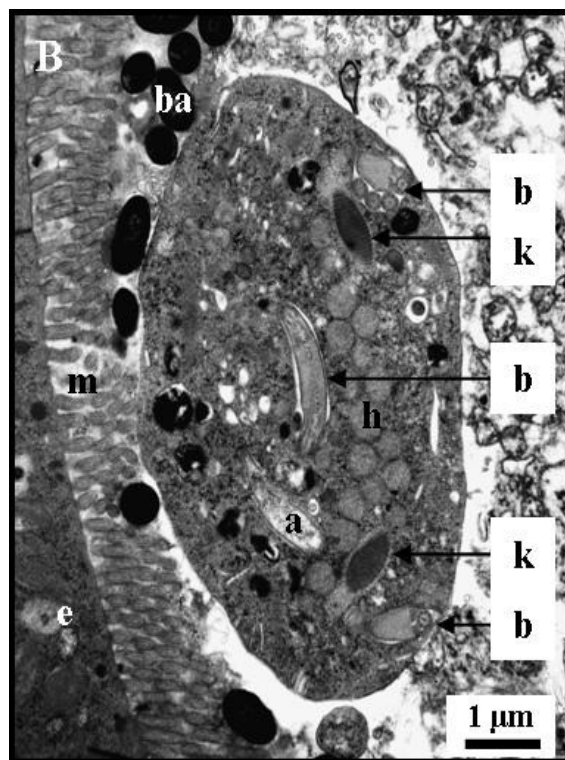
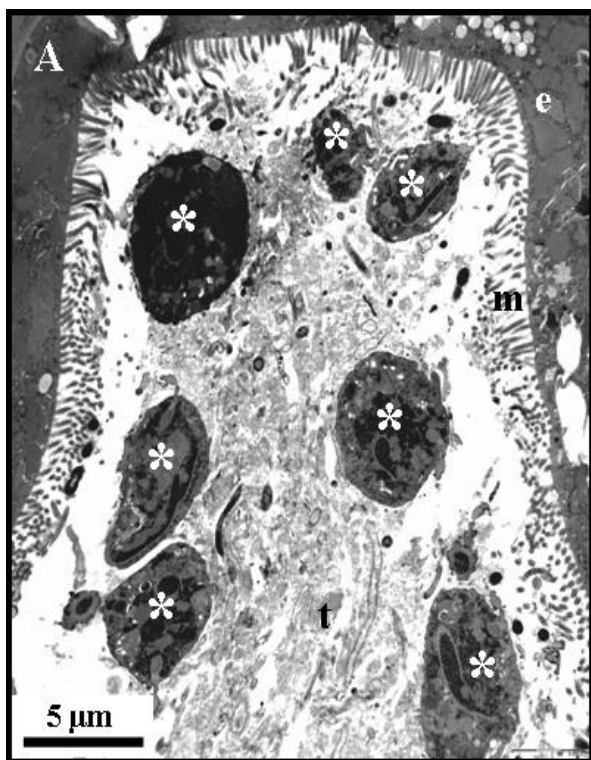
Označení myši	Druh roupa	Druh trichomonády	Tvorba pseudocyst
8	<i>A. tetraptera</i>	<i>T. muris</i>	ANO
10	<i>S. obvelata</i>	-	-
11	<i>S. obvelata</i>	<i>T. minuta</i>	NE
12	<i>A. tetraptera</i>	<i>T. muris</i>	ANO
18	<i>S. obvelata</i>	-	-
19	<i>S. obvelata</i>	<i>T. muris</i> , <i>T. minuta</i>	NE, NE
21	<i>A. tetraptera</i>	<i>T. muris</i>	ANO
	<i>S. obvelata</i>	<i>T. muris</i>	ANO
23	<i>A. tetraptera</i>	<i>T. muris</i>	NE
24	<i>A. tetraptera</i>	<i>T. muris</i>	ANO

5.4.3 Popis nalezených trichomonád

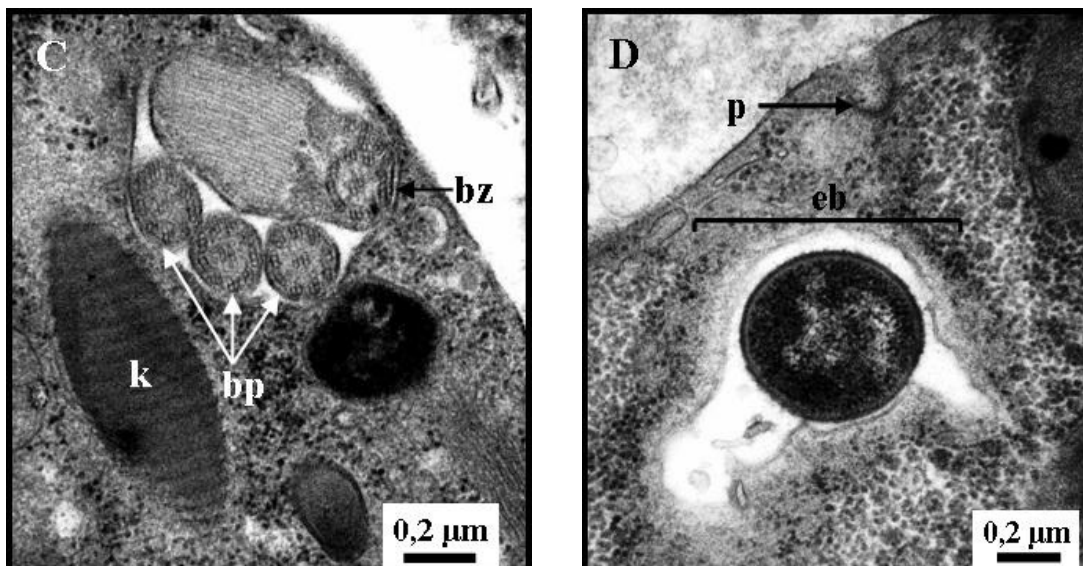
Trichomonády nebyly nalezeny na řezech v jiné lokalizaci než ve střevě. Při pohledu do lumenu střeva byly v trávenině spolu s dalšími objekty (kvasinky, bakterie) opakovaně nacházeny buňky trichomonád a byla určena jejich příslušnost do druhu (viz kap. 5.4.2). Buňky prvoků se nacházely volně v lumenu střeva a nebylo zaznamenáno, že by interagovaly s epitelem střeva roupa (viz obr. 6A). Byla zdokumentována přítomnost endocytovaných bakterií v buňkách trichomonád (viz obr. 6D). Nikdy nebylo zaznamenáno buněčné dělení. Bylo zjištěno, že ve střevě roupa jsou trichomonády schopny tvořit pseudocysty. Nebyly pozorovány žádné morfologické rozdíly mezi trichomonádami nacházejícími se v odlišných částech střeva.

5.4.3.1 Nálezy pseudocyst *Tritrichomonas muris*

Trichomonáda *Tritrichomonas muris* byla opakovaně nalézána jak ve formě trofozoitů (stejně jako *Tritrichomonas minuta*), tak ve formě pseudocyst, a to v obou druzích roupů (viz tab. 15). Buňky trichomonád se při tvorbě pseudocyst zakulacují a internalizují bičíky (viz obr. 6B,C). Zaznamenána byla přítomnost jak formujících se pseudocyst, tak již plně zakulacených pseudocyst, a to jak v přední, tak i ve střední části střeva (pomocí TEM byly studovány pouze tyto části střeva).



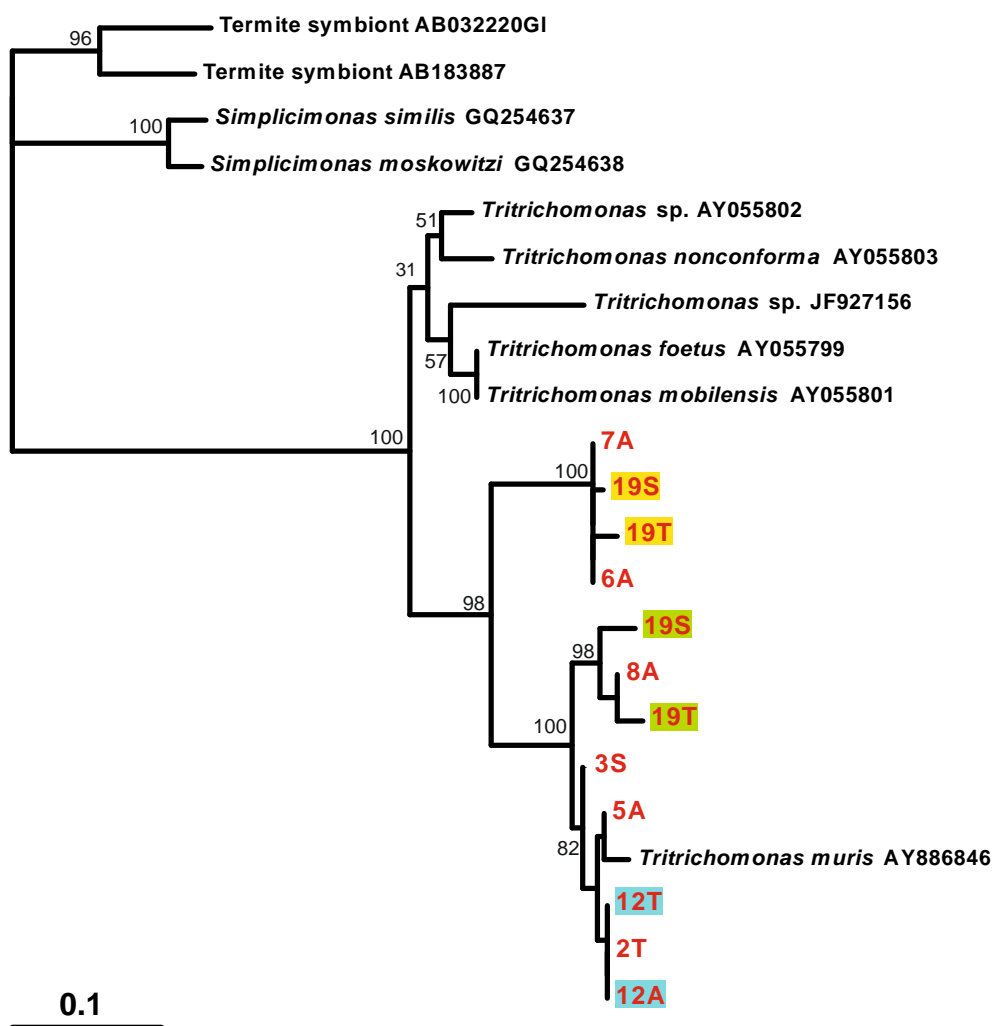
Vysvětlivky jsou na další straně.



Obr. 6. Endocytóza a tvorba pseudocyst trichomonádami ve střevě myších roupů. A: Celkový pohled na trofozoity trichomonád ve střevě roupa *Aspiculuris tetraptera*. **B:** Pseudocysta *Tritrichomonas muris*. **C:** Detail internalizovaných bičků v pseudocystě *Tritrichomonas muris*. **D:** Endocytóza. **a** axostyl, **ba** bakterie, **b** bičík, **bp** přední bičík, **bz** zadní bičík, **e** střevní epitel, **eb** endocytovaná bakterie **h** hydrogenosomy, **k** kostka, **m** mikrovili, **p** probíhající pinocytóza, * buňky trichomonád.

5.5 Fylogenetická analýza

Fylogenetická analýza sloužila k určení druhů trichomonád přítomných v tělech roupů a trávenině myši. Pomocí PCR nebo nested PCR a následné sekvenace SSU rDNA bylo celkem získáno 13 sekvencí SSU rDNA trichomonád, z toho 8 z pozitivních roupů (5 vzorků z druhu *Aspiculuris tetraptera* a 3 z druhu *Syphacia obvelata*) a 5 z obsahu slepého střeva myši. Jedna z těchto pěti sekvencí z tráveniny byla pomocí metody blast na databázi NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) určena jako *Pentatrichomonas hominis* (100% identita se sekvencemi HQ149968, HQ149969, DQ412643, DQ412642, DQ412641, DQ412640). Z ostatních 12 sekvencí, patřících rodu *Tritrichomonas*, byl sestaven fylogenetický strom (obr. 7). Jako „outgroup“ byly použity sekvenace blízce příbuzných organismů rodů *Simplicimonas* a *Tritrichomonas*.



Obr. 7. Nezakořeněný fylogenetický strom znázorňující vzájemné fylogenetické vztahy trichomonád z myších roupů a z tráveniny myši s blízce příbuznými zástupci z řádu *Tritrichomonadida* (metoda maximum likelihood).

Čísla u větvení vyjadřují hodnoty bootstrapu pro jednotlivé větve. Nově získané sekvence jsou označeny červeně. Kód vzorku se skládá z čísla vzorku (myši) a písmene (A – vzorek trichomonád z roupů *A. tetraptera*, S – vzorek trichomonád z roupů *S. obvelata*, T – vzorek trichomonád z tráveniny myši). U vzorků ze stejné myši (č. 12 – jednoduchá infekce a č. 19 – smíšená infekce), kde byli zpracováni jak pozitivní roupi, tak trávenina je použit shodně barevný podklad. U smíšeného vzorku č. 19 je použita vždy jedna barva pro sekvence trichomonád stejného druhu.

Fylogenetická analýza potvrdila s vysokou statistickou podporou příslušnost trichomonád z roupů a tráveniny myši k rodu *Tritrichomonas*. Nově určené sekvence tvořily společně s druhem *Tritrichomonas muris* silně podpořenou monofyletickou linii. Nově osekvenované vzorky byly robustně rozděleny do dvou skupin. Větší a více diverzifikovaná skupina vzorků 19S, 8A, 19T, 3S, 5A, 12T, 2T a 12A obsahovala i sekвени druhu *T. muris*, a tyto naše vzorky proto hodnotíme jako tento druh. Druhá skupina obsahující vzorky 7A, 19S, 19T a 6A nejspíše odpovídá druhu *Tritrichomonas minuta* (viz níže). Vzorky z myši č. 19 byly smíšené (obsahovaly dva druhy trichomonád).

Zařazení sekvencí trichomonád z jednotlivých skupin do druhů *T. muris* a *T. minuta* bylo podpořeno zpracováním několika vzorků ze stejných myší dalšími metodami. U myší č. 6, 8 a 12 byli někteří pozitivní roupi druhu *A. tetraptera* zpracováni technikou klasické histologie a řezy byly obarveny Giemsou (viz kap. 4.2.3.2). Trichomonády nalezené v roupech z myší č. 8 a 12 byly proměřeny a bylo zjištěno, že buňky dosahují délky 14 až 20 μm , a může se tedy jednat o *T. muris*. Trichomonády v roupech z myši č. 6 dosahovaly velikosti 6 – 10 μm , což odpovídá druhu *T. minuta*. Pozitivní roupi z myši č. 12 a 19 byli také zpracováni pro TEM a trichomonády přítomné v jejich střevě byly podle struktury undulující membrány určeny do druhu (viz kap. 5.4.1.). V roupech *A. tetraptera* z myši č. 12 byly nalezeny trichomonády druhu *T. muris*. V případě roupů *S. obvelata* z myši č. 19 se jednalo o směsnou infekci, nalezeny byly buňky prvoků druhu *T. muris* i *T. minuta*, což odpovídá umístění vzorků ve fylogenetickém stromě.

6 DISKUZE

Experimenty ukázaly, že pro studium vztahu trichomonád a roupů (zejména pro identifikaci druhu a lokalizaci trichomonád) je výhodné použít kombinaci několika metodických přístupů. V našem případě jsme testovali použití klasických histologických barvení a dalších barvicích technik (barvení protargolem podle Bodiana, stříbření AgNO_3) na histologické řezy pozitivních roupů, transmisní elektronovou mikroskopii, chromogenní *in situ* hybridizaci a molekulárně fylogenetickou analýzu.

6.1 Výskyt trichomonád v tělech myších roupů

Přítomnost trichomonád ve střevě roupů byla v první fázi hodnocena pitevně. Rozložení případů podle intenzity infekce myši a intenzity výskytu trichomonád v roupech naznačuje, že existuje rozdíl mezi jednotlivými druhy roupů. U roupů *Aapiculuris tetraptera* byla častěji zaznamenána střední nebo vysoká intenzita infekce trichomonádami při střední nebo vysoké intenzitě infekce v hostitelské myši, a to oproti roupům *Syphacia obvelata*, kde byla častěji pozorována slabá intenzita infekce trichomonádami nebo byli roupi na trichomonády negativní. Také z procentuálního vyjádření je patrné, že trichomonády se častěji vyskytují v roupech *A. tetraptera* (roupi *A. tetraptera* byli pozitivní v 56% případů oproti 35% u *S. obvelata*). Častější výskyt trichomonád v roupech druhu *A. tetraptera* oproti *S. obvelata* byl již popsán (u *A. tetraptera* v 52,5% případů, procentuální údaj pro *S. obvelata* v práci chybí) (Theiler a Farber, 1936). Nicméně nález je překvapivý vzhledem k místu výskytu roupů jednotlivých druhů v hostiteli. Je známo, že *A. tetraptera* parazituje převážně v tlustém střevě a *S. obvelata* ve slepém střevě myši, přičemž hlavní místo výskytu trichomonád je také slepé střevo. Co je tedy příčinou toho, že jsou prvoci častěji nalézáni právě v roupech, kteří sdílí místo parazitace s trichomonádami jen částečně, oproti roupům, kteří jej sdílí plně? Jelikož trichomonády nebyly pozorovány v larvách červů, je velmi nepravděpodobné, že by prvoci byli pozřeni během migrace vylíhnutých larev ze slepého střeva do tlustého střeva. Můžeme se pouze domnívat, že příčinou je nějaký rozdíl v příjmu potravy jednotlivými druhy roupů. Je známo, že hlístice jsou schopny selektovat mezi různými druhy bakterií a eliminovat příjem těch, které jsou pro ně patogenní (Rae a kol., 2008), a podobný mechanismus by se mohl z určitého důvodu uplatňovat i v příjmu potravy u myších roupů.

V žádném z našich případů nebyl zaznamenán výskyt trichomonád v roupech pocházejících z myši bez infekce trichomonádami. Theiler a Farber (1936) ale našli

„pozitivní“ roupý i v „negativních“ myších, a na základě toho zformulovali hypotézu o možném přenosu trichomonád vajíčky myších roupů, a to analogicky ke zdokumentovanému způsobu přenosu *Histomonas meleagridis*. Na základě našeho pozorování (absence nálezu „pozitivních“ roupů v „negativní“ myši) není možné se k jejich teorii přiklonit.

Vedlejším výstupem z dat získaných během pitev je zjištění, že přibližně stejně často jako infekce jedním druhem červa se vyskytují koinfekce oběma druhy. Je známo, že infekce oběma druhy jsou běžné (Bazzano a kol., 2002). U roupů *A. tetraptera* dochází pravděpodobně vlivem koinfekce k redukci počtu červů ve střevě hostitele – při jednoduché infekci byly ve střevě hostitele zaznamenány vyšší počty roupů tohoto druhu oproti případům s koinfekcí oběma druhy. U roupů druhu *S. obvelata* tento jev pozorován nebyl – u jednoduché infekce a u koinfekce byl nalézán podobný počet roupů. Příčinou tohoto jevu by mohla být kompetice o živiny mezi jednotlivými druhy roupů (se silnějším kompetitorem *S. obvelata*), spíše než kompetice o prostor, protože roupí se v hlavním místě výskytu ve střevě hostitele liší a roupí *S. obvelata* se ve slepém střevě setkají s tráveninou dřívě, než roupí *A. tetraptera* v tlustém střevě.

Z dat získaných během pitev by bylo možné odhalit závislost mezi frekvencí výskytu trichomonád v roupech, intenzitou infekce myši a počtem roupů ve střevě myši, pokud by taková závislost existovala. Takové korelace by pak mohly naznačit vztahy mezi roupou a prvky (například kompetici nebo trofickou závislost). V případě, že by trichomonády byly v přenosu na nové hostitele závislé na roupech, pak by se měly častěji vyskytovat u myší hostících roupou. Kategorizace intenzit infekce a výskytu trichomonád probíhala na základě subjektivně stanovených kritérií a rozptyl hodnot vyjadřujících počet roupů ve střevě byl široký. Z toho důvodu nebyla data vhodná pro seriózní statistickou analýzu, která by doložila nebo vyvrátila naznačené hypotézy.

K dokumentaci přítomnosti trichomonád v tělech roupů bylo použito jednak technik klasické histologie, a jednak jsme se pokusili aplikovat některé protozologické barvicí techniky na histologické řezy „pozitivních“ roupů.

Z klasických barvení bylo použito barvení pomocí hematoxylin-eosinu, dále Giemsovo barvení a také barvení methylenovou modří-bazickým fuchsinem. Pro zalévání roupů bylo použito JB-4 médium, o jehož použití jsme rozhodli na základě velikosti zpracovávaných roupů a houževnatosti jejich kutikuly. Všechna barvení byla úspěšně aplikována na histologické řezy a každé poskytlo mírně odlišné výsledky ve znázornění morfologických struktur trichomonád ve střevě roupů. Nejvíce struktur bylo rozpoznáno

při barvení Giemsou (jádro, axostyl, undulující membrána, kosta), o něco horší výsledek přineslo barvení hematoxylin-eosinem (znázorněn byl axostyl a jádro, v některých případech také kosta) a nejméně uspokojivého výsledku bylo dosaženo barvením methylenovou modří-bazických fuchsinem (znázorněn byl pouze axostyl a jádro). Srovnání několika barvení vedlo k výběru nejvhodnější techniky (barvení Giemsou) pro další použití v pokusech – lokalizaci trichomonád mimo střevou roupů (viz kap.6.2).

Kromě technik klasické histologie jsme se ve snaze znázornit morfologické struktury prvků rozhodli aplikovat na histologické řezy barvení protargolem podle Bodian. Toto barvení bylo aplikováno na histologické parafínové řezy ke znázornění nervových vláken a dalších struktur (Bodian, 1936; Kusuzaki a kol., 1995). V našem případě jsme však z důvodů zmíněných výše přistoupili k zalévání do JB-4 média. O použití barvení protargolem na řezy v JB-4 médiu však chybí informace, a tak nezbylo, než postup vyzkoušet. Ukázalo se, že metoda v našem případě není vhodná, protože i důkladně přischlé řezy z krycích sklíček během dlouhé procedury barvení sklouzly. Postup nebylo možné významným způsobem zkrátit a od dalších pokusů aplikovat barvení protargolem na řezy v JB-4 médiu jsme proto upustili.

Další metodou, která byla použita za účelem znázornění bičíků trichomonád, bylo stříbření pomocí AgNO_3 . I tato metoda, kromě toho, že je klasickou metodou stříbření bičíků nálevníků a jiných bičíkatých protist, je využívána v histologii, a to například ke znázornění nukleových kyselin na parafínových řezech tkání (Eslami, 2006). Pokus stříbřit řezy zalité v JB-4 médiu však nepřinesl žádný výsledek. Na řezech nedošlo k vývoji barveného signálu a to pravděpodobně díky nevhodnosti metakrylátové pryskyřice JB-4 pro tento účel.

6.2 Určení lokalizace trichomonád v tělech roupů

Pro určení lokalizace trichomonád v tělech roupů bylo využito několik metod. Zprvce to byla klasická histologie. Prvoci byli vyhledáváni pod světelným mikroskopem na příčných řezech roupů barvených Giemsou, tedy barvením, kterým bylo podle našich zkušeností dosaženo nejlepšího znázornění morfologických struktur. Na řezech deseti samic roupů obou druhů byly trichomonády nalezeny pouze v lumenu střeva. Záchyt prvků v lumenu střeva rouna touto metodou se jevil jako spolehlivý.

Morfologie trichomonád, které ve svém životním cyklu mají morfologické stadium vyskytující se v tkáních hostitele, je rozmanitá. Pokud by trichomonády byly přítomny

mimo střevo roupa, mohou se zde vyskytovat v jiné morfologické formě, nežli v lumenu střeva. Proto ani pečlivá práce při prohlížení histologických řezů obarvených Giemsou nemohla zaručit jejich odhalení trichomonád mimo střevo. Trichomonády adherující k tkáním hostitele tvoří obvykle améboidní morfotyp s panožkami, jako je tomu u *Trichomonas vaginalis* (Arroyo a kol., 1993), *Trichomonas gallinae* (Kietzmann, 1993) a *Tritrichomonas foetus* (Midlej a kol., 2009). V některých případech (*Histomonas meleagridis*) pronikají hlouběji do hostitelských tkání a internalizují bičíky. V roupím přenašeči se vyskytují v rozličných formách – ve vas deferens samců roupů jako zakulacené formy (Lee, 1971), ve vajíčkách v děloze samic s podstatně zvětšeným jádrem a malým objemem cytoplasmy (Gibbs, 1962) a v přechodných formách.

Řešením problému bylo použití techniky chromogenní *in situ* hybridizace. Na podélných histologických řezech roupů zalitých v JB-4 médiu byl detekován signál odpovídající buňkám prvoků, a to díky použití sondy pro sekvenci 18S rDNA specifické pro trichomonády (Mostegl a kol., 2010). Použití metody samotné sice neumožnilo druhovou determinaci nalezených prvoků, nicméně při zajímavém nálezu (signálu mimo střevo roupa) by bylo možné druh determinovat pomocí zpracování pozitivních roupů z té samé myši dalšími metodami (molekulární analýzou nebo TEM). Přestože po optimalizaci postupu (viz níže) byly prohlédnuty řezy nezanedbatelného množství pozitivních roupů (22 samic), nacházel se signál vždy pouze v lumenu střeva roupů. Mimostřevní lokalizace nebyla zaznamenána.

Množství pokusů aplikovat techniku *in situ* hybridizace (ISH) na histologické řezy v JB-4 médiu je v literatuře velmi omezené. Jak práce, ve které byla navrhována sekvence oligonukleotidové sondy specifické pro trichomonády (Mostegl a kol., 2010), tak naprostá většina dalších publikací aplikují ISH na parafrínové řezy. Při optimalizaci postupu pro JB-4 jsme vycházeli jednak z postupu Chvala a kol. (2006), na který odkazuje předchozí citovaná práce (Mostegl a kol., 2010), a zdrojem informací byla také metodologická studie zabývající se detekcí DNA cytomegaloviru na řezech tkáně zalitých v glykol-metakrylátové pryskyřici (Cao a Beckstead, 1989).

Prvním problémem v proceduře bylo smývání řezů ze sklíček a to i za důkladného přischnutí při 56°C po dobu 24 hodin. Problém byl odstraněn použitím povrchově upravených sklíček Superfrost Plus. Při aplikaci původního postupu (Mostegl a kol., 2010) bylo dosaženo pouze velmi slabého a velmi těžko rozpoznatelného signálu. Dále byly proto vyzkoušeny další varianty. K proteolýze byla původně použita proteináza K v koncentraci 2,5 µg/ml, takže dále byla vyzkoušena zvýšená koncentrace proteinázy K – 50 µg/ml –

a také pepsin v koncentraci 4 mg/ml (Cao a Beckstead, 1989). Doba proteolýzy byla testována ve variantách 0,5, 1, 2, 3 a 4 hodiny. Koncentrace sondy byla z původních 20 ng/ml zvýšena na 200 a 2000 ng/ml. Jako alternativa bylo též vyzkoušeno zalévací médium LR White. Obecně se zvyšováním koncentrace chemikálií sílila intenzita dosaženého signálu. Jako optimální bylo shledáno použití pepsinu v koncentraci 4mg/ml (s proteinázou K nebylo dosaženo zlepšení ani za použití vyšší koncentrace), doby proteolýzy 2 hodiny (při 3 a 4 hodinách již signál nesílil, ale zato bylo dosaženo přílišné destrukci tkání) a koncentrace sondy 2000 ng/ml. Hybridizace probíhala ve vlhké komůrce nejprve pod krycím sklem, ale později bylo vypořádováno, že lepších výsledků je dosaženo bez krycího skla. Postup bez krycího skla umožnil nanést na oblast řezu větší množství hybridizační směsi a zároveň byla omezena tvorba artefaktů v podobě obarvených zbytků hybridizační směsi zachytávajících se na okrajích řezu. Tvorba artefaktů a pozadí byla dále značně potlačena díky intenzivnějším oplachům SSC pufrům oproti původnímu protokolu. Doba oplachů byla zvýšena z 10 na 15 minut a poslední (třetí) proplach byl zdvojen na 2x po 15 minutách. Použití LR White média za stejných podmínek jako JB-4 se ukázalo jako nevhodné – u LR White média docházelo k tvorbě silného pozadí a dosažený signál byl slabší. V počátečních pokusech jsme na závěr procesu prováděli barvení hematoxylin-eosinem (Mostegl a kol., 2010). Došlo však k zabarvení tkání takovým způsobem, že nebylo možné jasně odečíst signál odpovídající trichomonádám a proto jsme od tohoto kroku ustoupili. I bez barvení bylo při správném zaclonění a proostření pod mikroskopem jasně patrné, ve kterém tělním kompartmentu roupa se signál nachází. Teplotní podmínky, doba hybridizace, složení pufrů, poměr chemikálií v hybridizační směsi a způsob vizualizace z původního protokolu byly dodrženy.

Vzorky primárně určené pro zpracování *in situ* hybridizací byly fixovány v 7% pufovaném formaldehydu, nicméně do pokusu byly nakonec zahrnuty také starší vzorky fixované v Bouinově fixáži a uchované v 70% etanolu až po dobu 12 měsíců. I když i u nejstarších vzorků bylo dosaženo signálu, který byl alespoň v některých případech vhodný pro odečítání přítomnosti trichomonád, tento signál byl vždy slabší, než u vzorků fixovaných ve formaldehydu. Se stářím vzorku síla signálu klesala.

V pokusech s ISH nebyly použity kontroly – dosahovaný signál byl jednoznačný, neměli jsme problém s nespecifickou reakcí sondy a přítomnost trichomonád ve vyšetřovaných roupech byla při pitvách ověřována vizuálně.

Ačkoli transmisní elektronová mikroskopie primárně sloužila k popisu prvků ve střevě roupů a determinaci jejich druhu, zhotovené ultratenké řezy byly vždy prohlíženy komplexně pro případný záchyt prvků v mimostřevní lokalizaci. K takovému nálezu ale nedošlo.

Negativní výsledek při hledání trichomonád mimo střevo roupa pravděpodobně není způsoben nedostatečným množstvím vyšetřených roupů – při hledání prvoka *Histomonas meleagridis* v tělech samic *Heterakis gallinarum* (Gibbs, 1962) byli prvoci nalezeni ve všech vzorcích z 12 červů získaných z krůt se souběžnou nákazou prvoky. Lze tedy předpokládat, že pokud by hypotéza o přenosu myších trichomonád byla platná, prvoci by byli při zpracovaném množství samic roupů (22 pomocí CISH, 10 pomocí klasické histologie, 10 pomocí TEM) mimo střevo nalezeni.

6.3 Určení druhů trichomonád

Pro určení druhů trichomonád přítomných v roupech byla využita molekulárně fylogenetická analýza genu pro RNA malé ribozomální podjednotky, TEM, a histologie.

Molekulární analýza si žádala drobná přizpůsobení, jako bylo použití kontrol ke každému vzorku pozitivních roupů (vzorek z tekutiny, ve které byli roupi oplachováni) a snížení koncentrace $MgCl_2$ v reakční směsi pro PCR oproti původnímu protokolu od výrobce chemikálií pro PCR. Vzhledem k různému počtu pozitivních roupů nalezených v myších a rozdílnému množství DNA ve vzorcích musely být podmínky přizpůsobovány pro každý vzorek zvlášť. Zejména bylo podle potřeby měněno použití klasické a nested PCR a počet teplotních cyklů u klasické PCR bylo v extrémních případech použito i 40 a 45 cyklů. U některých vzorků se buďto nepodařilo DNA trichomonád amplifikovat vůbec, nebo se následně z přečištěné DNA nepodařilo získat kvalitní sekvence. V případě směsného vzorku (obsahujícího 2 druhy trichomonád) byl fragment zaklonován do plasmidu a jednotlivé druhy byly osekvenovány až po vyhledání kolonií s příslušným inzertem.

Z fylogenetické analýzy vyplývá, že získané sekvence trichomonád náleží do rodu *Tritrichomonas*. Sekvence vytvořily ve fylogenetickém stromě dvě skupiny, z nichž jedna velmi pravděpodobně odpovídá druhu *Tritrichomonas muris* a druhá *Tritrichomonas minuta*. Toto zjištění bylo potvrzeno souběžným použitím dalších metod umožňujících druhovou determinaci prvků – klasickou histologií a transmisní elektronovou mikroskopií. Při proměřování trichomonád na histologických preparátech hraniční rozměry (délky)

nalezených prvků nezapadaly úplně přesně do udávaných rozpětí hodnot (4 – 20 μm oproti udávaným 16 – 26 μm u *T. muris* a 6 – 10 μm oproti 4 – 9 μm u *T. minuta*)(Flynn, 2007). Tento mírný rozdíl mohl být způsoben změnou tvaru buněk při zpracování nebo nepřesností měření. Sekvence *T. minuta* jsou prvními získanými sekvencemi tohoto druhu. Skupina ve fylogenetickém stromě odpovídající *T. muris* byla více diverzifikovaná než skupina *T. minuta*. U vzorků z případu se směsnou infekcí (č. 19), které jediné byly zaklonovány, mohla být určitá míra variability vnesena tímto procesem. U ostatních vzorků byla také pozorována vnitrodruhová variabilita, jmenovitě u vzorku 5A bylo při práci se sekvencemi patrné, že se jedná o směsný vzorek (obsahující pravděpodobně více genotypů *T. muris*).

Kromě určení druhu trichomonád přítomných v roupech nám analýza přinesla další informace, a to v případech, kdy byla zpracována jak trávenina, tak roupi obsahující trichomonády. Vysoká míra příbuznosti trichomonád nacházejících se uvnitř a vně roupa vylučuje možnost, že trichomonády v roupech jsou jejich specifickým parazitem odlišného od druhu, vyskytujícího se ve střevě myši. Je zdokumentováno, že myši roupi jsou schopni selektivně přijímat učitě druhy bakterií (Dunning a Wright, 1970) a je tedy pravděpodobné, že by se podobný princip mohl vyvinout i v příjmu prvků. Důvodem selektivního příjmu určitých druhů bakterií nematody z prostředí je například jejich patogenita (Rae a kol., 2008; Schulenburg a Ewbank, 2007) nebo rozdílná výživová hodnota (Shtonda a Avery, 2006). V případě směsné infekce myši oběma druhy trichomonád jsme zjistili, že ze strany roupů není uplatněna striktní selektivita co do druhu „přijímaných“ trichomonád (metoda PCR neodráží kvantitu trichomonád jednotlivých druhů v roupech) – jak ve střevě myši, tak ve střevě roupa se vyskytují oba druhy trichomonád, *T. muris* i *T. minuta*.

Kromě molekulární analýzy byla pro determinaci druhů trichomonád využita i transmisní elektronová mikroskopie. Proces přípravy vzorku vycházel ze základního pracovního postupu (Jana Bulantová, ústní sdělení) používaného v Helmintologické laboratoři Katedry parazitologie PřF UK především pro zpracování vývojových stadií ptačích motolic. Za účelem optimálního fixování vzorku byl postup upraven podle protokolu z ultrastrukturní studie hlístic *Heterakis spumosa* (Mehlhorn a Harder, 1997), které jsou velikostně srovnatelné s myšimi roupy *A. tetraptera* a *S. obvelata*. Modifikace spočívala ve zvýšení koncentrace glutaraldehydu ve fixační tekutině z 2,5% na 5%, a po půl hodině lázně ve fixáži byla roupům žiletkou odříznuta přední a zadní část těla.

Určování prvků do rodu a druhu pomocí TEM probíhalo podle ultrastrukturních znaků. O rodové příslušnosti rozhodovala hlavně struktura mastigontu, undulující membrány a kosty. Mastigont prvků rodu *Tritrichomonas* se odlišuje od dalších rodů

trichomonád vyskytujících se ve střevě myši počtem bičíků. Rod *Tritrichomonas* má 3 přední a 1 zadní bičík, zatímco pro rody *Hexamastix* a *Pentatrichomonas* je typický počet bičíků 5 plus 1 zadní, který navíc u rodu *Hexamastix* netvoří undulující membránu. Na řezu undulující membránou prvoků rodu *Tritrichomonas* axonema bičíku přisedala apikálně k výběžku cytoplazmatické membrány tvořícím spolu s bičíkem undulující membránu, a jednalo se tedy o membránu typu „rail type“ typickou pro rod *Tritrichomonas*. Kosta u rodu *Tritrichomonas* vykazovala na řezu žíhání typu A. O příslušnosti do druhu *T. muris*/*T. minuta* pak rozhodovala struktura undulující membrány na příčném řezu (Brugerolle, 1981). Undulující membrány obou druhů se na řezu liší v přítomnosti (*T. muris*)/nepřítomnosti (*T. minuta*) krystalinní struktury provázející axonemu bičíku. V roupech byly nalezeny trichomonády obou druhů. V roupech *S. obvelata* ze 2 myší (celkem byli na TEM zpracováni roupi obou druhů z 9 myší) nebyli prvoci nalezeni, a to pravděpodobně z toho důvodu, že se ve střevě roupa nacházeli v příliš malém počtu pro záchyt pomocí TEM.

Kombinací výsledků druhové determinace prvoků všemi metodami (molekulární analýza, TEM, klasická histologie) lze uzavřít, že v obou druzích myších roupů byly nalezeny 2 druhy trichomonád – *T. muris* a *T. minuta* – a to buďto samostatně, nebo v koinfekci. Původní práce (Theiler a Farber, 1936) popisující výskyt trichomonád v myších roupech však determinuje prvoky nalezené v roupech pouze jako *T. muris*. Trichomonády dosahovaly délky 6,7 – 24 μm a šířky 4,7 – 18 μm . Z uvedeného rozpětí velikostí lze usuzovat, že určení druhu trichomonád je mylné a že ve skutečnosti se i v tomto případě jednalo o dva druhy trichomonád rozlišitelných podle velikosti – menší *T. minuta* s typickou délkou 4 – 9 μm a šířkou 2 – 5 μm a větší *T. muris* s typickou délkou 16 – 26 μm a šířkou 10 – 14 μm . Velikost objektu může být ovlivněna typem použité fixáže. Nicméně průměrné délky měřených prvoků ve skupinách zpracovaných odlišnými fixážemi se lišily jen o desetiny mikrometrů (Champyho fixáž 13,7 μm ; Schaudinova fixáž 12,8 μm ; Zenkerova fixáž 14,1 μm)(Theiler a Farber, 1936). Zdá se tedy pravděpodobné, že ve vzorcích se vyskytovaly 2 druhy morfologicky podobných, ale rozměrově odlišných trichomonád.

6.4 Trichomonády ve střevě roupů pohledem TEM

Zda trichomonády interagují s epitelem střeva roupů, zda se ve střevě roupa dělí a k jakým dalším procesům zde dochází bylo studováno pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Pokud by platila hypotéza o přenosu trichomonád vajíčky roupů (Becker, 1933; Theiler a Farber, 1936), je možné předpokládat, že vstup prvoků do rozmnožovací soustavy červů by probíhal střevní stěnou červů. Stejným způsobem probíhá přenos trichomonády *Histomonas meleagridis* vajíčky ptačí škrkavky *Heterakis gallinarum* (Gibbs, 1962). TEM ale neprokázala jakoukoliv interakci trichomonád se střevním epitelem. Dále nebyl získán důkaz, že by prvoci podstupovali buněčné dělení, což je v rozporu s výsledkem, kdy bylo zaznamenáno buněčné dělení trichomonád v trávenině roupů (Theiler a Farber, 1936). Absence nálezu dělicích se trichomonád mohla být ale způsobena nedostatečným množstvím zpracovaných vzorků.

Naproti tomu jsme opakovaně zaznamenali přítomnost pseudocyst *Tritrichomonas muris* ve střevě obou druhů myších roupů. Pseudocysty u *T. muris* jsou vylučovány s trusem myši (Koyama a kol., 1987), a pouze ve své rané formě jsou infekční pro nového hostitele. Proces tvorby pseudocyst je do jisté míry vratný – trofozoiti mohou konvertovat na pseudocysty a zpět (Jelen, 1954; Mattern a Daniel, 1980). Pseudocysty v čase postupně degenerují ve větší, tmavé, neinfekční pseudocysty, jejich undulující membrána se přestává pohybovat a buňky lyzují (Stachan a kol., 1984). Tvorbu a diferenciaci pseudocyst je možné indukovat změnou vnějších podmínek. Například při provedení roztěru obsahu slepého střeva se zde přítomní trofozoiti *T. muris* začnou měnit na pseudocysty (Stachan a kol., 1984). I u příbuzných prvoků rodu *Tritrichomonas* (*Tritrichomonas foetus*) je dokázáno, že pseudocysty se tvoří v reakci na stres (Mariane a kol., 2004). Lze se logicky domnívat, že tvorba pseudocyst *T. muris* ve střevě roupů je právě reakcí na určitou nepřízeň podmínek. Na druhou stranu u blíže příbuzného prvoka *T. foetus* bylo zdokumentováno, že pseudocysty jsou schopny adheze k epitelům pohlavní soustavy, a to dokonce ve větší míře než trofozoiti (Mariane a kol., 2004). To naznačuje možnost, že by morfologickou formou zodpovědnou za případnou interakci trichomonád s tkání roupa mohly být i v našem případě právě pseudocysty. Nicméně vzhledem k tomu, že nebyla zaznamenána žádná interakce pseudocyst se střevním epitelem roupa, se zdá tato varianta nepravděpodobná. Absence nálezu pseudocyst v původní práci (Theiler a Farber, 1936) mohla být způsobena tím, že roupí byli zpracováni pouze histologicky a pseudocysty tak mohly uniknout pozornosti.

U *Tritrichomonas minuta* pseudocysty doposud nebyly popsány a ani v této práci nebyla zaznamenána jejich přítomnost. Tato skutečnost může být vysvětlena třemi způsoby: buďto *T. minuta* v životním cyklu stadium pseudocysty postrádá, anebo jsme pseudocysty nenalezli z toho důvodu, že nebyly ve vzorcích početné a pomocí TEM nebyly zachyceny. Třetí vysvětlení je, že *T. minuta* je sice pseudocysty schopná tvořit, ale v prostředí střeva roupů k jejich tvorbě nedochází z toho důvodu, že je na toto prostředí lépe adaptovaná, než *T. muris*. Pokud by byla *T. minuta* na pobyt v těle roupa lépe adaptovaná, je pravděpodobnost přenosu roupů u tohoto druhu vyšší než u příbuzné *T. muris* (ta v roupech tvoří pseudocysty možná v reakci na nepříznivé podmínky). Nezbytný důkaz pro podporu hypotézy přenosu však nebyl nalezen.

V trávenině ve střevě roupů byly jak pomocí TEM, tak i na preparátech zhotovených klasickou histologií, nalézány kromě prvoků i další organismy – kvasinky a bakterie. Kvasinky a bakterie často přiléhaly k mikrovilům střevních epitelálních buněk červa. To je v souladu s popisy podobných nálezů u mikroorganismů ve střevě roupů *Aspiculuris tetraptera* (Lee a Anya, 1968) a mikroorganismů přítomných ve střevě myši nutných k ustavení infekce roupů *A. tetraptera* a *Syphacia obvelata* (Przyjalkowski, 1972).

6.5 Význam interakce myších trichomonád a roupů pro přenos trichomonád na nové hostitele?

Na otázku, zda jsou myší trichomonády přenášeny díky své přítomnosti v tělech (vajíčkách) myších roupů, naznačují výsledky práce negativní odpověď. Trichomonády nebyly nalezeny v žádném tělním kompartmentu kromě střeva, nevykazují interakce se střevním epitelem a tvoří pseudocysty, které jsou pravděpodobně reakcí na nepříznivé prostředí. Tato odpověď je v rozporu s nálezy (Becker, 1933; Theiler a Farber, 1936) na jejichž základě byla hypotéza o přenosu vyslovena. Je těžké zpětně určit, zda nález trofozoitů *Tritrichomonas muris* ve vajíčku *Syphacia obvelata* (Becker, 1933) mohl být pouhým artefaktem. Neschopnost prokázat trichomonády ve střevě myší, ze kterých byli získáni červi s prvoky ve střevě (Theiler a Farber, 1936) mohla být způsobena pozdním vyšetřením tráveniny. To ale autoři v článku nepřipouští. Druhým vysvětlením by mohlo být přežití prvoků v tělech roupů až do doby, kdy vymizí infekce prvoky ze střeva myši působením imunity hostitele (Ranford a kol., 2001). K podobným nálezům (přítomnosti prvoků v červovi a nikoliv savčím hostiteli), které zůstaly nevysvětleny, došlo i v případě

přítomnosti *Giardia viscaciae* ve střevě hlístice *Vianella* sp. (Thomson, 1925 cit. dle Graham, 1935) a prvoků *Giardia* sp. ve střevě hlístic *Cooperia oncophora* z býka (Graham, 1935).

Navzdory předchozím nálezům svědčícím pro hypotézu přenosu se na základě výsledků této diplomové práce přikláníme k hypotéze opačné – výskyt trichomonád ve střevě hlístic je čistě náhodný, způsobený pobytem obou parazitů v podobné lokalizaci ve střevě hostitele – myši.

Pokud trichomonády v roupech nejsou přítomny za účelem přenosu na nové hostitele, je na místě uvažovat o dalších příčinách, které by mohly být zodpovědné za zdokumentovanou asociaci. Takovou příčinou by mohlo být využití trichomonád k výživě roupů. Platnost této teorie by však měla být podpořena důkazem, že trichomonády jsou ve střevě roupa tráveny. Výsledky z TEM ale takový důkaz nepřinesly, neboť morfologická podoba trichomonád napříč střevem (alespoň jeho přední a střední části) se nelišila. Častější přítomnost trichomonád ve střevě roupů *Aspicularis tetraptera*, tedy právě toho ze dvou druhů myších roupů, který s trichomonádami nesdílí hlavní místo výskytu ve střevě, nabízí teorii opačnou: trichomonády z určitého důvodu nejsou pro roupy k výživě vhodné, roupi druhu *S. obvelata* (osidlující shodnou část hostitelského střeva jako trichomonády) jsou na koexistenci s prvoky lépe adaptováni a omezují příjem trichomonád z tráveniny.

Bylo by vhodné pomocí TEM prostudovat morfologickou podobu trichomonád v zadní části střeva roupů a porovnat ji s nálezy z přední a střední části střeva. Nález pozdních pseudocyst by mohl potvrdit naši hypotézu, že trichomonády ve střevě roupa podstupují degenerativní proces. Nález narušených buněk trichomonád by mohl znamenat, že trichomonády jsou roupy tráveny.

7 ZÁVĚR

Pomocí klasické histologie a dalších technik jsme zdokumentovali výskyt trichomonád ve střevech myších rouků *Aspiculuris tetraptera* a *Syphacia obvelata*. Trichomonády nebyly nalezeny v roucích z myši bez nákazy prvoky. Trichomonády se častěji vyskytují v roucích druhu *A. tetraptera*, který se vyskytuje hlavně v tlustém střevě myši, oproti druhu *S. obvelata*, který parazituje hlavně ve slepém střevě. Důvod vyšší frekvence výskytu prvoků v roucích *A. tetraptera*, kteří s trichomonádami (na rozdíl od rouků druhu *S. obvelata*) nesdílí hlavní místo výskytu ve střevě hostitele, zůstal neobjasněn.

Jedinou lokalizací trichomonád v tělech rouků byl lumen střeva, což bylo prokázáno především pomocí techniky chromogenní *in situ* hybridizace (CISH), ale také klasické histologie a transmisní elektronové mikroskopie (TEM).

Trichomonády nalezené v roucích příslušely do druhů *Tritrichomonas muris* a *Tritrichomonas minuta*, což bylo určeno pomocí molekulární analýzy a podpořeno nálezy z TEM a klasické histologie. Stejně druhy trichomonád se vyskytovaly v trávenině myši i ve střevě rouků z té samé myši, a to jak u jednoduché (prokázáno u rouků obou druhů), tak u smíšené infekce oběma druhy trichomonád (prokázáno u rouků druhu *S. obvelata*). U rouků se neuplatňovala selektivita/preference vůči druhu přijímaných trichomonád.

Prvoci ve střevě rouků byla studována pomocí TEM. Trichomonády ve střevě roupa neinteragují s epitelem, byla dokumentována endocytóza bakterií, avšak nebylo prokázáno buněčné dělení prvoků. Druh *T. muris* ve střevě roupa tvoří pseudocysty, pravděpodobně v reakci na nepřízeň vnějších podmínek.

Vzhledem k výsledkům shrnutým výše se domníváme, že výskyt trichomonád v tělech rouků je čistě náhodný a trichomonády nejsou přenášeny roupy na nové hostitele (myš).

Během práce byly vyzkoušeny a optimalizovány některé metody (CISH, TEM), které by následně mohly být využity ke studiu dalších uvažovaných vztahů hlístice-prvok, například k ověření přenosu trichomonády *Dientamoeba fragilis* prostřednictvím rouků *Enterobius vermicularis*.

8 SEZNAM LITERATURY

- Amos, W.B., Grimstone, A.V., Rothschild, L.J., Allen, R.D. (1979) Structure, protein composition and birefringence of the costa – motile flagellar root fiber in the flagellate *Trichomonas*. *Journal of Cell Science*, **35**, 139-164.
- Anderson, G.L., Caldwell, K.N., Beuchat, L.R., Williams, P.L. (2003) Interaction of a free-living soil nematode, *Caenorhabditis elegans*, with surrogates of foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Food Protection*, **66**(9), 1543-1549.
- Ardila-Garcia, A.M. a Fast, N.M. (2011) Novel microsporidian species infects the free-living marine nematode *Odontophora rectangula*. *Journal of Phycology*, **47**, S23-S23.
- Arroyo, R. a Alderete, J.F. (1989) *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infection and Immunity*, **57**(10), 2991-2997.
- Arroyo, R., Engbring, J., Alderete, J.F. (1992) Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Microbiology*, **6**(7), 853-862.
- Arroyo, R., Gonzalezroble, A., Martinezpalomo, A., Alderete, J.F. (1993) Signaling of *Trichomonas vaginalis* for ameboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. *Molecular Microbiology*, **7**(2), 299-309.
- Babal, P. a Russell, L.C. (1999) Sialic acid-specific lectin-mediated adhesion of *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas mobilensis*. *Journal of Parasitology*, **85**(1), 33-40.
- Barratt, J.L.N., Harkness, J., Marriott, D., Ellis, J.T., Stark, D. (2011) The ambiguous life of *Dientamoeba fragilis*: the need to investigate current hypotheses on transmission. *Parasitology*, **138**, 557-572.
- Bazzano, T., Restel, T.I., Pinto, R.M., Gomes, D.C. (2002) Patterns of infection with the nematodes *Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera* in conventionally maintained laboratory mice. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**(6), 847-851.
- Becker, R.E. (1933) Two observations on helminths. *Transactions of the American Microscopical Society*, **52**, 361-362.
- Behnke, J.M. (1974) Distribution of larval *Aspiculuris tetraptera* Schulz during a primary infection in *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* and *Apodemus sylvaticus*. *Parasitology*, **69**, 391-402.
- Bird, A.F. a Akhurst, R.J. (1983) The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. *International Journal for Parasitology*, **13**(6), 599-606.
- Bodian, D. (1936) A new method for staining nerve fibers and nerve endings in mounted paraffin sections. *The Anatomical Record*, 89-97.
- Bowman, D.D., Block, G., Tanneberger, A. (1990) *Giardia* sp. in the intestine of *Nematodirus helvetianus* (Nematoda, Trichostrongyloidea) recovered at necropsy from a sheep (*Ovis aries*). *Transactions of the American Microscopical Society*, **109**(4), 422-424.
- Bradley, R.E. a Reid, W.M. (1966) *Histomonas meleagridis* and several bacteria as agents of infectious enterohepatitis in gnotobiotic turkeys. *Experimental Parasitology*, **19**(1), 91-&.
- Brassinga, A.K.C., Kinchen, J.M., Cupp, M.E., Day, S.R., Hoffman, P.S., Sifri, C.D. (2010) *Caenorhabditis* is a metazoan host for *Legionella*. *Cellular Microbiology*, **12**(3), 343-361.
- Bristol, J.R., Pinon, A.J., Mayberry, L.F. (1983) Interspecific interactions between *Nippostrongylus brasiliensis* and *Eimeria niechulzi* in the rat. *Journal of Parasitology*, **69**(2), 372-374.
- Brugerolle, G. (1981) The fine structure of the undulating membrane as a feature differentiating the 2 species of *Tritrichomonas* – *Tritrichomonas muris* (Grassi) and

- Tritrichomonas minuta* (Wenrich, 1924) parasites of rodents. *Protistologica*, **17**(3), 431-438.
- Burgess, D.E. a McDonald, C.M. (1992) Analysis of adhesion and cytotoxicity of *Tritrichomonas foetus* to mammalian cells by use of monoclonal antibodies. *Infection and Immunity*, **60**(10), 4253-4259.
- Burrows, R.B. a Swerdlow, M.A. (1956) *Enterobius vermicularis* as a probable vector of *Dientamoeba fragilis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **5**(2), 258-265.
- Callait-Cardinal, M.P., Chauve, C., Reynaud, M.C., Alogninouwa, T., Zenner, L. (2006) Infectivity of *Histomonas meleagridis* in ducks. *Avian Pathology*, **35**(2), 109-111.
- Cao, M. a Beckstead, J.H. (1989) Localization of cytomegalovirus DNA in plastic-embedded sections by *in situ* hybridization. A methodologic study. *American Journal of Pathology*, **134**(2), 457-463.
- Čepicka, I., Kutigová, K., Tachezy, J., Kulda, J., Flegr, J. (2005) Cryptic species within the *Tetratrichomonas gallinarum* species complex revealed by molecular polymorphism. *Veterinary Parasitology*, **128**(1-2), 11-21.
- Čepička, I., Hampl, V., Kulda, J., Flegr, J. (2006) New evolutionary lineages, unexpected diversity, and host specificity in the parabasalid genus *Tetratrichomonas*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **39**, 542-551.
- Chan, K.F. (1955) The distribution of larval stages of *Aspiculuris tetraptera* in the intestine of mice. *Journal of Parasitology*, **41**(5), 529-532.
- Chan, K.F. a Kopilof, S. (1958) The distribution of *Syphacia obvelata* in the intestine of mice during their migratory period. *Journal of Parasitology*, **44**(2), 245-246.
- Chantanao, A. a Jensen, H.J. (1969) Saprozoic nematodes as carriers and disseminators of plant pathogenic bacteria. *Journal of Nematology*, **1**(3), 216-218.
- Christensen, N.O., Nansen, P., Fagbemi, B.O., Monrad, J. (1987) Heterologous antagonistic and synergistic interactions between helminths and between helminths and protozoans in concurrent experimental infection of mammalian hosts. *Zeitschrift Fur Parasitenkunde-Parasitology Research*, **73**(5), 387-410.
- Chute, A.M. a Lund, E.E. (1974) *Heterakis gallinarum* in Guinea fowl, *Numida meleagris* - survival and comparative potential for transmitting *Histomonas meleagridis*. *Experimental Parasitology*, **35**(1), 102-109.
- Chvala, S., Fragner, K., Hackl, R., Hess, M., Weissenböck, H. (2006) *Cryptosporidium* infection in domestic geese (*Anser anser f. domestica*) detected by in-situ hybridization. *Journal of Comparative Pathology*, **134**(2-3), 211-218.
- Ciche, T.A. a Ensign, J.C. (2003) For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(4), 1890-1897.
- Ciche, T.A., Kim, K.S., Kaufmann-Daszczuk, B., Nguyen, K.C.Q., Hall, D.H. (2008) Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**(8), 2275-2287.
- Corbeil, L.B., Hodgson, J.L., Jones, D.W., Corbeil, R.R., Widders, P.R., Stephens, L.R. (1989) Adherence of *Tritrichomonas foetus* to bovine vaginal epithelial cells. *Infection and Immunity*, **57**(7), 2158-2165.
- Crotti, D., Sensi, M., Crotti, S., Grelloni, V., Manuali, E. (2007) *Dientamoeba fragilis* in swine population: a preliminary investigation. *Veterinary Parasitology*, **145**(3-4), 349-351.
- Das, S. and Raski, D.J. (1968) Vector efficiency of *Xiphinema index* in transmission of grapevine fanleaf virus. *Nematologica*, **14**(1), 55-62.

- Davidson, W.R., Doster, G.L., McGhee, M.B. (1978) Failure of *Heterakis bonasae* to transmit *Histomonas meleagridis*. Avian Diseases, **22**(4), 627-632.
- Davis, L.R., Herlich, H., Bowman, G.W. (1960a) Studies on experimental concurrent infections of dairy calves with coccidia and nematodes. 3. *Eimeria* spp. and the threadworm *Strongyloides papillosus*. American Journal of Veterinary Research, **21**(81), 181-187.
- Davis, L.R., Herlich, H., Bowman, G.W. (1960b) Studies on experimental concurrent infections of dairy calves with coccidia and nematodes. 4. *Eimeria* spp. and the small hairworm, *Trichostrongylus colubriformis*. American Journal of Veterinary Research, **21**(81), 188-194.
- Dissanaike, A.S. (1954) *Giardia ovis* in the intestine of *Nematodirus fillicollis* - a paraneoxeneous association. Rivista Parasitologica, 381-390.
- Dunning, E.M. a Wright, K.A. (1970) Isolation of bacteria from the intestines of the mouse pinworms and from their host, Canadian journal of zoology, 1443-1444.
- Duszynski, D.W., Russell, D., Roy, S.A., Castro, G.A. (1978) Suppressed rejection of *Trichinella spiralis* in immunized rats concurrently infected with *Eimeria nieschulzi*. Journal of Parasitology, **64**(1), 83-88.
- Emelianoff, V., Chapuis, E., Le Brun, N., Chiral, M., Moulia, C., Ferdy, J.B. (2008) A survival-reproduction trade-off in entomopathogenic nematodes mediated by their bacterial symbionts. Evolution, **62**(4), 932-942.
- Emelianoff, V., Sicard, M., Le Brun, N., Moulia, C., Ferdy, J.B. (2007) Effect of bacterial symbionts *Xenorhabdus* on mortality of infective juveniles of two *Steinernema* species. Parasitology Research, **100**(3), 657-659.
- Eslami, B. (2006) Diagnostic value of silver nitrate staining for nucleolar organizer regions in selected head and neck tumors. Journal of Cancer Research and Therapeutics, **2**(3)129-131.
- Estes, K.A., Szumowski, S.C., Troemel, E.R. (2011) Non-lytic, actin-based exit of intracellular parasites from *C. elegans* intestinal cells. Plos Pathogens, **7**(9), e1002227.
- Fine, P.E.M. (1975) Quantitative studies on transmission of *Parahistomonas wenrichi* by ova of *Heterakis gallinarum*. Parasitology, **70**, 407-417.
- Fischer, K., Beatty, W.L., Jiang, D.J., Weil, G.J., Fischer, P.U. (2011) Tissue and stage-specific distribution of *Wolbachia* in *Brugia malayi*. Plos Neglected Tropical Diseases, **5**(5), e1174.
- Flynn, R.J. (2007) Parasites of laboratory animals, Ames, Iowa : Blackwell Pub., c2007.
- Foster, J., Ganatra, M., Kamal, I., Ware, J., Makarova, K., Ivanova, N., Bhattacharyya, A., Kapatral, V., Kumar, S., Posfai, J., Vincze, T., Ingram, J., Moran, L., Lapidus, A., Omelchenko, M., Kyrpides, N., Ghedin, E., Wang, S., Goltsman, E., Joukov, V., Ostrovskaya, O., Tsukerman, K., Mazur, M., Comb, D., Koonin, E., Slatko, B. (2005) The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. Plos Biology, **3**(4), 599-614.
- Gerbod, D., Edgcomb, V.P., Noel, C., Zenner, L., Wintjens, R., Delgado-Viscogliosi, P., Holder, M.E., Sogin, M.L., Viscogliosi, E. (2001) Phylogenetic position of the trichomonad parasite of turkeys, *Histomonas meleagridis* (Smith) Tyzzer, inferred from small subunit rRNA sequence. Journal of Eukaryotic Microbiology, **48**(4), 498-504.
- Gibbs, B.J. (1962) Occurrence of protozoan parasite *Histomonas meleagridis* in adults and eggs of cecal worm *Heterakis gallinae*. Journal of Protozoology, **9**(3), 288-293.
- Gilbert, R.O., Elia, G., Beach, D.H., Klaessig, S., Singh, B.N. (2000) Cytopathogenic effect of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured in vitro. Infection and Immunity, **68**(7), 4200-4206.

- Girginkardesler, N., Kurt, O., Kilimcioglu, A.A., Ok, U.Z. (2008) Transmission of *Dientamoeba fragilis*: evaluation of the role of *Enterobius vermicularis*. *Parasitology International*, **57**(1), 72-75.
- Goodrich-Blair, H. (2007) They've got a ticket to ride: *Xenorhabdus nematophila*-*Steinernema carpocapsae* symbiosis. *Current Opinion in Microbiology*, **10**(3), 225-230.
- Graham, G.L. (1935) *Giardia* infections in a nematode from cattle. *Journal of parasitology*, **20**(2), 127-128.
- Granger, B.L., Warwood, S.J., Benchimol, M., De Souza, W. (2000) Transient invagination of flagella by *Tritrichomonas foetus*. *Parasitology Research*, **86**(9), 699-709.
- Graybill, H.W. (1921) The incidence of blackhead and occurrence of *Heterakis papillosa* in a flock of artificially reared turkeys. *Journal of Experimental Medicine*, **33**, 667-673.
- Graybill, H.W. a Smith, T. (1920) Production of fatal blackhead in turkeys by feeding embryonated eggs of *Heterakis papillosa*. *Journal of Experimental Medicine*, **34**, 647-662.
- Greenberg, Z. a Spira, D.T. (1972) Hyperparasitism by *Giardia muris* and *Hexamita* so in adults and in larvae of *Nematospiroides dubius*. *Journal of Parasitology*, **58**(4), 749.
- Guindon, S. a Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, **52**(5), 696-704.
- Hampl, V., Vrlík, M., Čepicka, I., Pecka, Z., Kulda, J., Tachezy, J. (2006) Affiliation of *Cochlosoma* to trichomonads confirmed by phylogenetic analysis of the small-subunit rRNA gene and a new family concept of the order Trichomonadida. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**, 305-312.
- Hansen, R.D.E., Trees, A.J., Bah, G.S., Hetzel, U., Martin, C., Bain, O., Tanya, V.N., Makepeace, B.L. (2011) A worm's best friend: recruitment of neutrophils by *Wolbachia* confounds eosinophil degranulation against the filarial nematode *Onchocerca ochengi*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **278**(1716), 2293-2302.
- Harrison, B.D. a Winslow, R.D. (1961) Laboratory and field studies on relation of arabis mosaic virus to its nematode vector *Xiphinema diversicaudatum* (Micoletzky). *Annals of Applied Biology*, **49**(4), 621-633.
- Hess, M., Grabensteiner, E., Liebhart, D. (2006) Rapid transmission of the protozoan parasite *Histomonas meleagridis* in turkeys and specific pathogen free chickens following cloacal infection with a mono-eukaryotic culture. *Avian Pathology*, **35**(4), 280-231.
- Hewitt, W.B., Raski, D.J., Goheen, A.C. (1958) Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. *Phytopathology*, **48**(11), 586-595.
- Hodgkin, J. a Partridge, F.A. (2008) *Caenorhabditis elegans* meets Microsporidia: the nematode killers from Paris. *Plos Biology*, **6**(12), 2634-2637.
- Hu, J.H. a McDougald, L.R. (2003) Direct lateral transmission of *Histomonas meleagridis* in turkeys. *Avian Diseases*, **47**(2), 489-492.
- Jelen, P. (1954) *Mesocricetus auratus* jako pokusné zvíře v parazitologii, PřF UK, Diplomová práce.
- Johnigk, S.A. a Ehlers, R.U. (1999) Endotokia matricida in hermaphrodites of *Heterorhabditis* spp. and the effect of the food supply. *Nematology*, **1**(7-8), 717-726.
- Johnson, E.H., Windsor, J.J., Clark, C.G. (2004) Emerging from obscurity: biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. *Clinical Microbiology Reviews*, **17**(3), 553-570.
- Kalkofen, U.P. (1970) Attachment and feeding behavior of *Ancylostoma caninum*. *Zeitschrift Fur Parasitenkunde*, **33**(4), 339-354.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, **30**(14), 3059-3066.

- Kean, B.H. a Malloch, C.L. (1966) Neglected ameba - *Dientamoeba fragilis* - a report of 100 pure infections. American Journal of Digestive Diseases, **11**(9), 735-746.
- Kietzmann, G.E. (1993) Relationships of *Trichomonas gallinae* to the palatal-esophageal junction of ring doves (*Streptopelia risoria*) as revealed by scanning electron microscopy. Journal of Parasitology, **79**(3), 408-415.
- Knight, R. a Chew, L.H. (1974) The interaction between *Entamoeba histolytica* and *Trichuris muris* infections in mice. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, **590**-594.
- Koyama, T., Endo, T., Asahi, H., Kuroki, T. (1987) Life cycle of *Tritrichomonas muris*. Zentralblatt Fur Bakteriologie Mikrobiologie Und Hygiene Series a-Medical Microbiology Infectious Diseases Virology Parasitology, **264**(3-4), 478-486.
- Kudo, R. a Hetherington, D.C. (1922) Notes on a microsporidian parasite of a nematode, The Journal of Parasitology, **8**(3), 129-132.
- Kumar, M.J.M., Nagarajan, P., Venkatesan, R., Juyal, R.C. (2004) Case report and short communication: Rectal prolapse associated with an unusual combination of pinworms and citrobacter species infection in FVB mice colony. Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science, **31**(4), 221-223.
- Kusuzaki, K., Kageyama, N., Shinjo, H., Murata, H., Takeshita, H., Ashihara, T., Hirasawa, Y. (1995) A staining method for bone canaliculi. Acta Orthopaedica Scandinavica, **66**(2), 166-168.
- Lacharme-Lora, L., Perkins, S.E., Humphrey, T.J., Hudson, P.J., Salisbury, V. (2009a) Use of bioluminescent bacterial biosensors to investigate the role of free-living helminths as reservoirs and vectors of *Salmonella*. Environmental Microbiology Reports, **1**(3), 198-207.
- Lacharme-Lora, L., Salisbury, V., Humphrey, T.J., Stafford, K., Perkins, S.E. (2009b) Bacteria isolated from parasitic nematodes - a potential novel vector of pathogens? Environmental Health, **8**, 17.
- Landmann, F., Slatko, B., Foster, J.M., Sullivan, W. (2010) Asymmetric *Wolbachia* segregation during early *Brugia Malayi* embryogenesis determines its distribution in adult host tissues. Plos Neglected Tropical Diseases, **4**(7), e758.
- Landmann, F., Voronin, D., Sullivan, W., Taylor, M.J. (2011) Anti-filarial activity of antibiotic therapy is due to extensive apoptosis after *Wolbachia* depletion from filarial nematodes. Plos Pathogens, **7**(11), e1002351.
- Lee, D.L. (1969) Structure and development of *Histomonas meleagridis* (Mastigamoebidae - Protozoa) in female reproductive tract of its intermediate host, *Heterakis gallinarum* (Nematoda). Parasitology, **59**, 877-884.
- Lee, D.L. (1971) Structure and development of protozoon *Histomonas meleagridis* in male reproductive tract of its intermediate host, *Heterakis gallinarum* (Nematode). Parasitology, **63**, 439-445.
- Lee, D.L. a Anya, A.O. (1968) Studies on movement cytology and associated micro-organisms of intestine of *Aspiculuris tetraptera* (Nematoda). Journal of Zoology, **156**, 9-14.
- Lee, D.L., Long, P.L., Millard, B.J., Bradley, J. (1969) Fine structure and method of feeding of tissue parasitizing stages of *Histomonas meleagridis*. Parasitology, **59**, 171-184.
- Lehker, M.W. a Sweeney, D. (1999) Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. Sexually Transmitted Infections, **75**(4), 231-238.
- Lotfi, A.R., Abdelwhab, E.M., Hafez, H.M. (2012) Persistence of *Histomonas meleagridis* in or on materials used in poultry houses. Avian Diseases, **56**(1), 224-226.
- Lund, E.E. (1956) Oral transmission of *Histomonas* in turkeys. Poultry Science, **35**(4), 900-904.

- Lund, E.E. (1968) Acquisition and liberation of *Histomonas wenrichi* by *Heterakis gallinarum*. *Experimental Parasitology*, **22**, 62-67.
- Lund, E.E. a Chute, A.M. (1971) Bobwhite, *Colinus virginianus*, as host for *Heterakis* and *Histomonas*. *Journal of Wildlife Diseases*, **7**, 70-75.
- Lund, E.E. a Chute, A.M. (1972a) *Heterakis* and *Histomonas* infections in young peafowl, compared to such infections in pheasants, chickens, and turkeys. *Journal of Wildlife Diseases*, **8**, 352-358.
- Lund, E.E. a Chute, A.M. (1972b) Ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus torquatus*) as a host for *Heterakis gallinarum* and *Histomonas meleagridis*. *American Midland Naturalist*, **87**(1), 1-7.
- Lund, E.E., Wehr, E.E., Ellis, D.J. (1966) Earthworm transmission of *Heterakis* and *Histomonas* to turkeys and chickens. *Journal of Parasitology*, **52**, 899-902.
- Luo, F., Li, G.Q., Su, R.Q., Liang, G., Chen, Z.H., Hicham, W. (2010) Cloning and sequencing of adhesion protein gene of *Trichomonas gallinae* from pigeon. *Veterinary Parasitology*, **168**(1-2), 125-129.
- Mariante, R.M., Lopes, L.C., Benchimol, M. (2004) *Tritrichomonas foetus* pseudocysts adhere to vaginal epithelial cells in a contact-dependent manner. *Parasitology Research*, **92**(4), 303-312.
- Mattern, C.F.T. a Daniel, W.A. (1980) *Tritrichomonas muris* in the hamster - pseudocysts and the infection of newborn. *Journal of Protozoology*, **27**(4), 435-439.
- Mazet, M., Delbac, F., Vivares, C. (2007) Identification of energetic metabolism enzymes probably involved in adhesion of *Histomonas meleagridis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **54**(2), 25S.
- McDougald, L.R. a Fuller, L. (2005) Blackhead disease in turkeys: direct transmission of *Histomonas meleagridis* from bird to bird in a laboratory model. *Avian Diseases*, **49**(3), 328-331.
- McGarry, H.F., Egerton, G.L., Taylor, M.J. (2004) Population dynamics of *Wolbachia* bacterial endosymbionts in *Brugia malayi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **135**(1), 57-67.
- Medlin, L., Elwood, H.J., Stiskel, S., Sogin, M.L. (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, **71**(2), 491-499.
- Meerovitch, E. a Ghadirian, E. (1980) Effect of *Trichinella spiralis* infection on the experimental amebic liver-abscess in hamsters. *Archivos De Investigacion Medica*, **11**, 185-188.
- Mehlhorn, H. a Harder, A. (1997) Effects of the synergistic action of febantel and pyrantel on the nematode *Heterakis spumosa*: a light and transmission electron microscopy study. *Parasitology Research*, **83**(5), 419-434.
- Melvin, D.M. a Brooke, M.M. (1962) Parasitologic surveys on indian reservations in Montana, South Dakota, New Mexico, Arizona, and Wisconsin. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **11**(6), 765-772.
- Menghi, C.I., Makiya, R., Gatta, C.L., Mendez, O.C. (2005) *Dientamoeba fragilis*: molecular biology techniques for the elucidation of its mode of transmission. *Parasitología latinoamericana*, **60**, 25-31.
- Midlej, V., Vilela, R., Dias, A.B., Benchimol, M. (2009) Cytopathic effects of *Tritrichomonas foetus* on bovine oviduct cells. *Veterinary Parasitology*, **165**(3-4), 216-230.
- Morgan, J.A.W., Kuntzelmann, V., Tavernor, S., Ousley, M.A., Winstanley, C. (1997) Survival of *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens* in water and soil. *Journal of Applied Microbiology*, **83**(6), 665-670.
- Mostegl, M.M., Richter, B., Nedorost, N., Maderner, A., Dinhopf, N., Kulda, J., Liebhart, D., Hess, M., Weissenböck, H. (2010) Design and validation of an oligonucleotide probe

- for the detection of protozoa from the order Trichomonadida using chromogenic *in situ* hybridization. *Veterinary Parasitology*, **171**(1-2), 1-6.
- Nie, D. (1950) Morphology and taxonomy of the intestinal protozoa of the Guinea-pig, *Cavia porcella*. *Journal of Morphology*, **86**, 381-493.
- Norton, R.A., Clark, F.D., Beasley, J.N. (1999) An outbreak of histomoniasis in turkeys infected with a moderate level of *Ascaridia dissimilis* but no *Heterakis gallinarum*. *Avian Diseases*, **43**(2), 342-348.
- Ockert, G. (1972a) Epidemiology of *Dientamoeba fragilis* Jepps et Dobell 1918. 1. Distribution of species in children. *Journal of Hygiene Epidemiology Microbiology and Immunology*, **16**(2), 213-221.
- Ockert, G. (1972b) Epidemiology of *Dientamoeba fragilis* Jepps et Dobell 1918. 2. Test on transfer of species with *Enterobius* eggs. *Journal of Hygiene Epidemiology Microbiology and Immunology*, **16**(2), 213-221.
- Ockert, G. (1975) Problem of epidemiology of *Dientamoeba fragilis* Jepps et Dobell, 1918. 3. Further attempts to transfer through *Enterobius vermicularis* eggs. *Journal of Hygiene Epidemiology Microbiology and Immunology*, **19**(1), 17-21.
- Ockert, G. a Schmidt, T. (1976) Problem of *Dientamoeba fragilis* epidemiology Jepps et Dobell, 1918. 4. *Dientamoeba fragilis* proof in *Enterobius vermicularis* eggs by determining isoelectric point. *Journal of Hygiene Epidemiology Microbiology and Immunology*, **20**(1), 76-81.
- Ohara, T. a Reid, W.M. (1961) Histomoniasis in chickens: age of greatest susceptibility and pathogenicity studies. *Avian Diseases*, **5**, 355-361.
- O'Bannon, J.H. and Inserra, R.N. (1990) Nematode vectors - transmission of plant viruses, *Nematology Circular No.* 178.
- Panter, H.C. (1969) Studies on host-parasite relationships - *Syphacia obvelata* in mouse. *Journal of Parasitology*, **55**(1), 74-78.
- Pechová, H. a Foltan, P. (2008) The parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* defends its slug host from being predated or scavenged by manipulating host spatial behaviour. *Behavioural Processes*, **78**(3), 416-420.
- Pecka, Z., Nohynková, E., Kulda, J. (1996) Ultrastructure of *Cochlosoma anatis* Kotlan, 1923 and taxonomic position of the family Cochlosomatidae (Parabasala: Trichomonadida). *European Journal of Protistology*, **32**(2), 190-201.
- Pereira-Neves, A., Ribeiro, K.C., Benchimol, M. (2003) Pseudocysts in trichomonads - New insights. *Protist*, **154**(3-4), 313-329.
- Preiss, U., Ockert, G., Bromme, S., Otto, A. (1990) *Dientamoeba fragilis* infection, a cause of gastrointestinal symptoms in childhood. *Klinische Padiatrie*, **202**(2), 120-123.
- Prince, M.J.R. (1950) Studies on the life cycle of *Syphacia obvelata*, a common nematode parasite of rats. *Science*, **111**(2873), 66-67.
- Przyjalkowski, Z. (1972) Investigation on the establishment of *Aspiculuris tetraptera* Nitzsch, 1821 (Nematoda, Oxyuridae) in germfree mice. *Acta parasitologica polonica*, **20**, 389-395.
- Rae, R., Riebesell, M., Dinkelacker, I., Wang, Q., Herrmann, M., Weller, A.M., Dieterich, C., Sommer, R.J. (2008) Isolation of naturally associated bacteria of necromenic *Pristionchus nematodes* and fitness consequences. *Journal of Experimental Biology*, **211**(12), 1927-1936.
- Rae, R.G., Tournai, M., Wilson, M.J. (2010) The slug parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* associates with complex and variable bacterial assemblages that do not affect its virulence. *Journal of Invertebrate Pathology*, **104**(3), 222-226.
- Ranford, L.R., Jones, M.K., Prociv, P. (2001) *Giardia* trophozoites in dog hookworm, *Ancylostoma caninum*: accident or hyperparasitism? *Acta Tropica*, **80**(1), 77-79.

- Rausch, S., Held, J., Stange, J., Lendner, M., Hepworth, M.R., Klotz, C., Lucius, R., Pogonka, T., Hartmann, S. (2010) A matter of timing: Early, not chronic phase intestinal nematode infection restrains control of a concurrent enteric protozoan infection. *European Journal of Immunology*, **40**(10), 2804-2815.
- Riley, W.A. (1919) A mouse oxyurid, *Syphacia obvelata*, as a parasite of man, *The American Society of Parasitologists, The Journal of Parasitology*, **6**(2), 89-93.
- Robertsthompson, I.C., Grove, D.I., Stevens, D.P., Warren, K.S. (1976) Suppression of giardiasis during intestinal phase of trichinosis in mouse. *Gut*, **17**(12), 953-958.
- Schulenburg, H. and Ewbank, J.J. (2007) The genetics of pathogen avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Microbiology*, **66**(3), 563-570.
- Scott, M.E. and Gibbs, H.C. (1986) Long-term population dynamics of pinworms (*Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera*) in mice. *Journal of Parasitology*, **72**(5), 652-662.
- Shaia, C.I., Voyich, J., Gillis, S.J., Singh, B.N., Burgess, D.E. (1998) Purification and expression of the Tf190 adhesin in *Tritrichomonas foetus*. *Infection and Immunity*, **66**(3), 1100-1105.
- Shtonda, B.B. and Avery, L. (2006) Dietary choice behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Experimental Biology*, **209**(1), 89-102.
- Sicard, M., Le Brun, N., Pages, S., Godelle, B., Boemare, N., Moulia, C. (2003) Effect of native *Xenorhabdus* on the fitness of their *Steinernema* hosts: contrasting types of interaction. *Parasitology Research*, **91**(6), 520-524.
- Slatko, B.E., Taylor, M.J., Foster, J.M. (2010) The *Wolbachia* endosymbiont as an anti-filarial nematode target. *Symbiosis*, **51**(1), 55-65.
- Stachan, R., Nicol, C., Kunstyr, I. (1984) Heterogeneity of *Tritrichomonas muris* pseudocysts. *Protistologica*, **20**(2), 157-163.
- Stahl, W. (1961) Influences of age and sex on the susceptibility of albino mice to infection with *Aspiculuris tetraptera*. *Journal of Parasitology*, **47**(6), 939-941.
- Stark, D., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J., Harkness, J. (2005) Prospective study of the prevalence, genotyping, and clinical relevance of *Dientamoeba fragilis* infections in an Australian population. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**(6), 2718-2723.
- Stark, D., Phillips, O., Peckett, D., Munro, U., Marriott, D., Harkness, J., Ellis, J. (2008) Gorillas are a host for *Dientamoeba fragilis*: an update on the life cycle and host distribution. *Veterinary Parasitology*, **151**(1), 21-26.
- Stewart, G.L., Reddington, J.J., Hamilton, A.M. (1980) *Eimeria nieschulzi* and *Trichinella spiralis* - analysis of concurrent infection in the rat. *Experimental Parasitology*, **50**(1), 115-122.
- Sukanahaketu, S. (1977) Presence of *Dientamoeba fragilis* in *Ascaris lumbricoides* ova - 1st report from Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*, **60**, 256-258.
- Szathmar, S. (1966) Occurrence of *Microsporon gypseum* (Bodin Guart and Grigorakis) in soil nematodes. *Mycopathologia Et Mycologia Applicata*, **30**(3-4), 345-348.
- Tachezy, J., Tachezy, R., Hampl, V., Šedinova, M., Vaňáčová, S., Vřlik, M., Van Ranst, M., Flegel, J., Kulda, J. (2002) Cattle pathogen *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) and pig commensal *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond, 1843) belong to the same species. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **49**(2), 154-163.
- Tan, L. and Grewal, P.S. (2001) Pathogenicity of *Moraxella osloensis*, a bacterium associated with the nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita*, to the slug *Deroceras reticulatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(11), 5010-5016.
- Taylor, M.J., Bandi, C., Hoerauf, A. (2005) *Wolbachia* bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Advances in Parasitology*, Vol 60, **60**, 245-284.

- Theiler, H. and Farber, M.S. (1936) *Trichomonas Muris*, parasitic in the oxyurid nematodes, *Aspicularis tetraptera* and *Syphacia obvelata*, from white mice. *Parasitology*, **28**, 149-160.
- Troemel, E.R., Felix, M.A., Whiteman, N.K., Barriere, A., Ausubel, F.M. (2008) Microsporidia are natural intracellular parasites of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Plos Biology*, **6**(12), 2736-2752.
- Turner, J.D., Langley, R.S., Johnston, K.L., Gentil, K., Ford, L., Wu, B., Graham, M., Sharpley, F., Slatko, B., Pearlman, E., Taylor, M.J. (2009) *Wolbachia* lipoprotein stimulates innate and adaptive immunity through Toll-like receptors 2 and 6 to induce disease manifestations of filariasis. *Journal of Biological Chemistry*, **284**(33), 22364-22378.
- Vinayak, V.K. a Chopra, A.K. (1978) Interaction between *Entamoeba histolytica* and *Syphacia obvelata* infection in mice. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **72**(6), 549-551.
- von Allmen, N., Christen, S., Forster, U., Gottstein, B., Welle, M., Muller, N. (2006) Acute trichinellosis increases susceptibility to *Giardia lamblia* infection in the mouse model. *Parasitology*, **133**, 139-149.
- Wilson, M.J., Glen, D.M., George, S.K., Pearce, J.D. (1995) Selection of a bacterium for the mass-production of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda, Rhabditidae) as a biocontrol agent for slugs. *Fundamental and Applied Nematology*, **18**(5), 419-425.
- Yang, J. a Scholten, T. (1977) *Dientamoeba fragilis* - review with notes on its epidemiology, pathogenicity, and diagnosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **26**(1), 16-22.
- Zaragatzki, E., Hess, M., Grabensteiner, E., Abdel-Ghaffar, F., Al-Rasheid, K.A.S., Mehlhorn, H. (2010) Light and transmission electron microscopic studies on the encystation of *Histomonas meleagridis*. *Parasitology Research*, **106**(4), 977-983.

Sekundární citace:

- Thomson, J.G. (1925) A *Giardia* parasitic in a nematode living in the Viscacha. *Protozoology*, **1**, 1-16 cit. dle Graham, G.L. (1935) *Giardia* infections in a nematode from cattle. *Journal of Parasitology*, **1**, 127-128.
- Taylor, C.E. and Robertson, W.M. (1975) Acquisition, retention and transmission of viruses by nematodes. *Nematode Vectors of Plant Viruses*, Plenum Press, London. 253-276 cit. dle O'Bannon, J.H. and Inserra, R.N. (1990) Nematode vectors - transmission of plant viruses, *Nematology Circular No.* 178.